

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Sarkosin - jednoduchý test na rakovinu
prostaty

Eva Vávrová

Brno 2011

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6 – Zdravotnictví

Sarkosin - jednoduchý test na rakovinu prostaty

Autor: Eva Vávrová

Škola: Gymnázium, Brno-Řečkovice,
Terezy Novákové 2, 621 00 Brno
Sexta A

Konzultanti: Mgr. Michal Kuňák, Ph.D.
Mgr. Natalia Cernei
Mgr. Markéta Ryvolová, Ph.D.
Doc. Ing. René Kizek, Ph.D.

Brno 2011 - Jihomoravský kraj

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením svých konzultantů a s použitím odborné literatury i dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány a uvedeny na konci práce.

V dne

.....

podpis

Poděkování:

Mé poděkování patří v první řadě mému školnímu konzultantovi panu Mgr. Michalu Kuňákovi, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům z Laboratoře metalomiky a nanotechnologií Mendelovy univerzity za pomoc s uskutečněním praktické části této práce. Zvláště bych chtěla poděkovat paní Mgr. Natalii Cernei, paní Mgr. Markétě Ryvolová, Ph.D, panu Mgr. Ondřeji Zítkovi a panu Doc. Ing. René Kizekovi. Také děkuji panu RNDr. Michalu Masaříkovi, Ph.D z lékařské fakulty Masarykovy univerzity. V neposlední řadě také děkuji grantovému projektu IGA MZ 10200-3, díky kterému mohla být tato práce uskutečněna po stránce finanční.

Abstrakt

Nádory prostaty jsou v řadě rozvinutých zemí nejčastějším typem nádorových onemocnění a druhou nejčastější s nádory spojenou příčinou smrti v mužské populaci. Současným markerem nádorových onemocnění prostaty je tzv. prostatický specifický antigen, PSA, jehož malé množství je běžně epiteliálními buňkami prostaty vylučováno do krevního oběhu. Zvýšená hladina PSA v krvi však nesignalizuje pouze přítomnost nádoru prostaty, ale jakoukoliv abnormalitu této žlázy, rovněž je velmi individuální a proměnlivá. Proto je řada pacientů zbytečně podrobena dalším vyšetřením, která jsou spolehlivější, avšak dosti nepříjemná. Na druhou stranu má až 20 % mužů s nádory prostaty hladinu PSA v normálu. Mimoto hladina PSA nevyovídá o stupni agresivity nádoru. Proto je, zvláště v poslední době, kdy stále více stoupá incidence tohoto onemocnění, snaha najít spolehlivější marker nádorů prostaty, a tím zvýšit šance na úspěšnou léčbu. Jedním z potenciálních markerů nádorů prostaty je i sarkosin. Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat metodu pro rychlé a zároveň spolehlivé stanovení sarkosinu v různých biologických vzorcích, zejména v moči, v níž byly současně analyzovány, s využitím spektrofotometrie a potenciometrie, i jiné biochemické parametry. K detekci sarkosinu se jako nejvhodnější jeví dvě analytické metody – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ionexovou separací a kapilární elektroforéza. Dále pak byl v práci zkoumán vliv zinku, který by se v budoucnu mohl také využívat v diagnostice nádorů prostaty, na životnost nádorových prostatických buněk i hladinu sarkosinu.

Klíčová slova

sarkosin; nádorová onemocnění/karcinom prostaty; vyšetření prostaty;

vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC); kapilární elektroforéza (CE)

Abstract

Prostate cancer is in many developed countries the most common type of cancer and the second leading cause of cancer-related death in the male population. The marker of prostate cancer is called prostate specific antigen, PSA, whose small amount is normally secreted by prostatic epithelial cells into the bloodstream. However, increased level of PSA in the blood does not indicate only the presence of prostate cancer, but any abnormality of this gland; it is also very individual and variable. Therefore, many patients are needlessly indicated on other tests that are reliable, but unpleasant. On the other hand, 20 % of men with prostate cancer have PSA level in normal. In addition, the PSA level does not identify the degree of tumor aggressiveness. Therefore, particularly in recent years, when the incidence is steadily increasing, science needs to find a reliable marker of prostate cancer and thereby increase the chances for successful treatment. One of the potential markers of prostate cancer is sarcosine. The main objective of this study was to optimize the method for rapid and reliable determination of sarcosine in various biological samples, especially in urine, in which were also other biochemical parameters using spectrophotometry and potentiometry determined. For detection of sarcosine two different analytical methods – high-performance liquid chromatography with ion exchange separation and capillary electrophoresis were appropriated. Furthermore, the effect of zinc on viability of prostate cancer cells and amount of sarcosine was analyzed.

Key words:

sarcosine, prostate cancer, prostate examination,
high performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE)

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Teoretická část..... | 8 |
| 1. Úvod | 8 |
| 1.1. Prostata (předstojná žláza) | 9 |
| 1.2. Karcinom prostaty | 11 |
| 1.3. Vyšetření prostaty | 14 |
| 1.3.1. Vyšetření vedoucí ke stanovení diagnózy | 14 |
| 1.3.2. Sarkosin | 19 |
| 1.3.3. Vyšetření k potvrzení nádoru prostaty | 19 |
| 1.3.4. Vyšetření k potvrzení rozšíření nádoru mimo prostatu | 21 |
| 2. Cíle práce..... | 22 |
| Experimentální část..... | 23 |
| 3. Materiály a metody..... | 23 |
| 3.1. Materiály | 23 |
| 3.1.1. Chemikálie | 23 |
| 3.1.2. Biologické vzorky | 24 |
| 3.2. Metody..... | 25 |
| 3.2.1. HPLC | 25 |
| 3.2.2. CE..... | 27 |
| 3.2.3. Spektrofotometrie..... | 29 |
| 4. Výsledky a diskuze..... | 31 |
| 4.1. Analýza standardních roztoků sarkosinu | 31 |
| 4.1.1. HPLC | 31 |
| 4.1.2. CE..... | 33 |
| 4.2. Analýza buněčných lyzátů | 34 |
| 4.2.1. Vliv zinku na nádorové prostatické buňky | 34 |
| 4.2.2. Příprava buněčných lyzátů | 34 |
| 4.2.3. HPLC | 36 |
| 4.2.4. CE..... | 37 |
| 4.3. Analýza vzorků moči..... | 38 |
| 4.3.1. Biochemické parametry vzorků moči..... | 38 |
| 4.3.2. HPLC | 41 |
| 4.3.3. CE..... | 42 |
| 5. Závěr..... | 44 |
| 6. Seznam citací..... | 45 |
| 7. Seznam použitých zdrojů | 46 |

Teoretická část

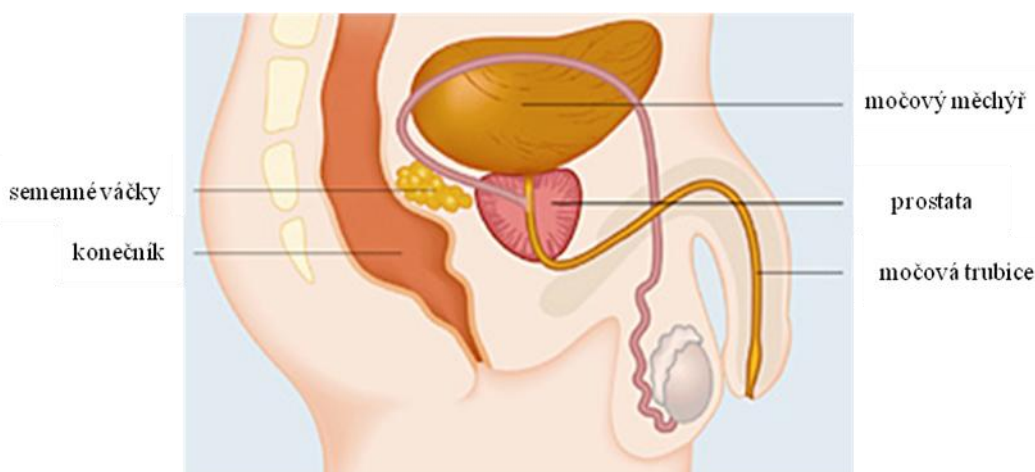
1. Úvod

Rakovina je jednou z nejobávanějších nemocí moderní doby. Rakovina prostaty je jedním z nejvíce rozšířených typů rakoviny u mužů, jen v ČR zemrou každý den 4 muži v důsledku tohoto onemocnění, což je více, než kolik jich zemře na následky dopravních nehod. Nyní však neexistuje test, který by tuto nemoc bezchybně rozpoznal, zvláště pak v jejím raném stádiu. Proto je, hlavně v poslední době, kdy stále více roste počet nově nemocných, snaha najít takovýto test, a tím zvýšit šanci na přežití pacientům postižených touto nemocí.

V nedávné době vědci objevili přítomnost látky sarkosinu v moči mužů, kteří touto nemocí trpí. Naopak ve vzorcích odebraným mužům bez rakoviny prostaty se sarkosin nevyskytoval, což by v budoucnu mohlo omezit počet chybných potvrzení rakoviny prostaty, která jsou v současnosti běžná. Tato práce je zaměřena na potvrzení role sarkosinu jako možného markeru rakoviny prostaty.

1.1. Prostata (předstojná žláza)

Prostata je součástí mužského vnitřního pohlavního systému. Nachází se v mužské pánvi mezi konečníkem a stydkou kostí přímo pod močovým měchýřem, kde obklopuje horní část močové trubice (obr. č. 1). Je to přídatná pohlavní žláza, tvořená několika samostatnými žlázkami, jejíž hlavní úkol je úzce spjat s rozmnožováním. Při ejakulaci se ze žlázy uvolňuje prostatický sekret, který tvoří zhruba 1/3 ejakulátu. Látky obsažené v této tekutině zvyšují pohyblivost spermií, zajišťují jejich delší životnost v kyselém prostředí ženských pohlavních orgánů a zároveň způsobují stahy děložního svalstva.



Obrázek č. 1 – Umístění prostaty v mužském těle, upraveno podle http://www.ibtbebig.eu/fileadmin/images/content/prostata_e.jpg

Během jednotlivých fází mužského života dochází k postupnému zvětšování prostaty. U novorozenců má velikost hrášku a váží zhruba 4 g. Během puberty, vlivem hormonů, dochází k jejímu zvětšení, kdy svými rozměry (cca 4 x 3 x 2 cm) a svojí vahou (cca 20 g) připomíná malou mandarinku. Po padesátém roce dochází opět ke zbytnění, v extrémních případech může tato žláza vážit až 200 g.

Prostatu postihují tři základní typy onemocnění:

a) Zánět prostaty (prostatitida)

Akutní zánět prostaty vzniká nejčastěji v důsledku pronikání bakterií, plísní a toxinů do prostaty přímo z tlustého střeva nebo při pohlavním styku. Infekce způsobí otok a následné zvětšení prostaty, která začne tlačit na močovou trubici, a tím dochází k problémům s močením. K léčení tohoto infekčního stavu postačí dávka antibiotik. V případě nedoléčení přechází akutní zánět v chronický, jehož léčba je náročnější.

b) Benigní hyperplazie prostaty

Po čtyřicátém roce dochází asi u poloviny celkové mužské populace, působením mužského pohlavního hormonu testosteronu, k nezhoubnému zvětšení prostaty v důsledku zmnožení jejích buněk.^[1] Zvětšením prostaty dochází ke stlačení močové trubice a následným problémům s mikcí v obstrukční sféře (= neprůchodnost, přerušovaný a slabý proud) i ve sféře iritační (= podráždění, urgentní mikce až inkontinence¹, nykturie²). V extrémních případech může dojít až k takovému stlačení močové trubice, jenž nedovoluje vylučování moči z těla. Benigní hyperplazie se nejčastěji léčí podáváním léku blokujících produkci mužských pohlavních hormonů nebo operací.

c) Nádorová onemocnění prostaty

Prostata patří mezi orgány, které jsou relativně často postihovány nádorovými onemocněními. Nejčastějším typem nádorového onemocnění postihujícího tento orgán je karcinom, zhoubný nádor vzniklý z epitelových buněk.

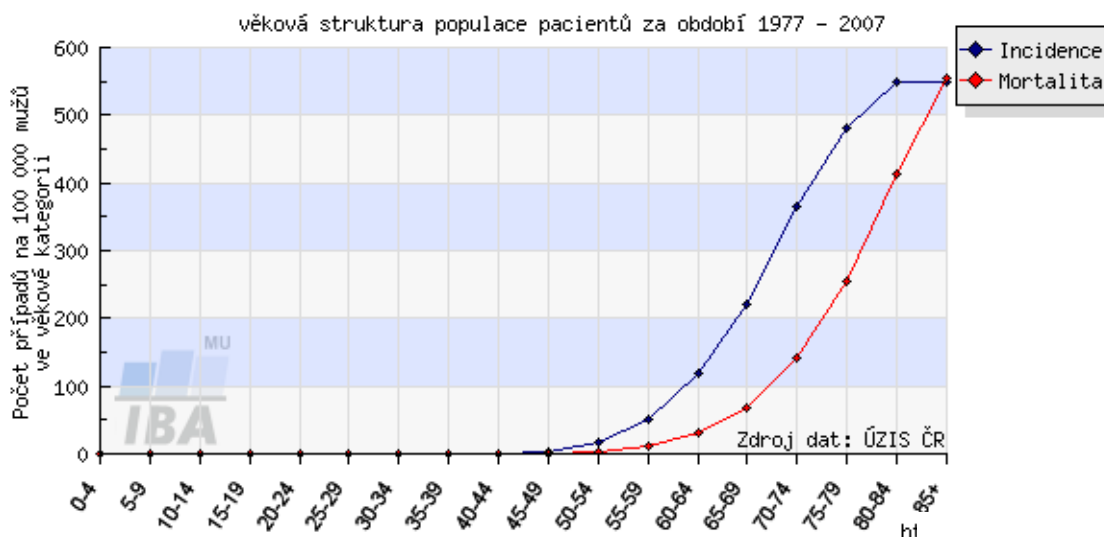
¹ únik moči

² nucení k močení v noční době

1.2. Karcinom prostaty

Jako maligní nádorové onemocnění prostaty bývá klinicky nejčastěji označován adenokarcinom³ prostaty, charakterizován abnormálním nekoordinovaným růstem epiteliálních prostatických buněk se ztrátou jejich původní funkce.^[2]

Jednotný mechanismus vzniku a rozšiřování karcinomu prostaty není dosud znám, pravděpodobně se jedná o soubor různých vlivů. Asi nejhlavnějším faktorem ovlivňujícím vznik karcinomu prostaty je věk (obr. č. 2), s každou dekádou života roste pravděpodobnost výskytu na dvojnásobek. Nezbytnou podmínkou pro vznik karcinomu prostaty je přítomnost androgenů, mužských pohlavních hormonů vznikajících ve varlatech. Dalšími faktory, které pravděpodobně přispívají ke vzniku nádorových onemocnění prostaty, jsou genetické dispozice, riziko výskytu pro syna otce majícího karcinom prostaty je asi trojnásobné, a etnický původ, nejvyšší incidence karcinomu prostaty je u amerických černochů, vyšší je také u indoevropské populace. Výživa s vyšším obsahem tuku pravděpodobně také podněcuje nádorový růst.



Obrázek č. 2 – Věkově specifická incidence a mortalita nádorů prostaty v ČR, zdroj: <http://www.svod.cz/report.php?diag=C61&type=pdf>

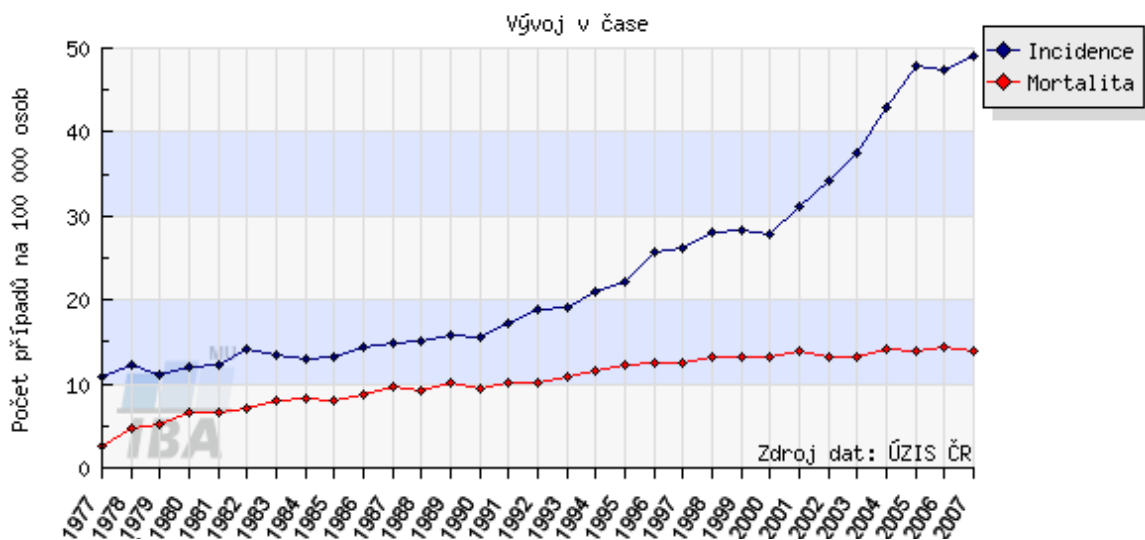
³ nádor vzniklý ze žlázoového epitelu

Pro karcinom prostaty neexistují typické příznaky. Obvykle roste v těle velmi pomalu, metastazuje relativně pozdě a díky svému umístění nezpůsobuje žádné viditelné symptomy. Pokud vyvolá nějaké potíže, většinou se již nemoc nachází v pokročilejším stádiu. Tyto příznaky však stále nejsou specifické, jsou totiž shodné se symptomy benigní hyperplazie prostaty. Nejčastěji se tedy jedná o problémy spojené s močením. V nejpokročilejším stádiu, když už se onemocnění rozšíří do okolí, se objevují nové symptomy. Časté jsou bolesti zad, žeber, kyčlí či ramen, což znamená, že se nádor rozšířil ke kostem a byly vytvořeny kostní metastázy. Tyto bolesti se často objevují, a pak zase mizí. Diagnóza může být stanovena až na základě patologické fraktury nebo otoků dolních končetin, které svědčí o postižení pánevních lymfatických uzlin. Také slabost, únava nebo obecné bolesti by mohly toto pokročilé stádium identifikovat. Avšak všechny uvedené symptomy jsou dosti individuální, většina pacientů uvádí jen několik málo symptomů, i když již trpí pokročilou fází nemoci. V některých případech se dokonce stává, že nemocný netrpí žádnými symptomy, a přesto je u něj odhaleno pokročilé stádium nádoru prostaty.

Poprvé se o nádorových onemocněních prostaty zmínil v roce 1832 Benjamin Brodie, který referoval o dvou případech tohoto onemocnění, kdy oba pacienti měli prostatu „tvrdou jako kámen“ s kostními metastázemi a neurologickou symptomatologií. Uplatnění markerů v diagnostice a monitorování karcinomu prostaty začíná roku 1938, kdy byl popsán vzestup kyselých fosfatáz v krevním séru pacientů s lokálně pokročilým karcinomem prostaty. Největším přínosem pro detekci této nemoci bylo objevení prostatického specifického antigenu v roce 1970 Robertem Benjaminem Ablinem. Chirurgickou léčbu karcinomu prostaty jako první popsali v roce 1904 urolog Hugh Hampton Young s asistencí chirurga Williama S. Halsteda. O čtyři roky později byla poprvé použita léčba ozářeními, při které bylo radium zavedeno přes močovou trubici pomocí cévky do prostatické části močové trubice. Později bylo radium aplikováno již přímo do prostaty. V roce 1941 Charles B. Huggins prokázal, že karcinom prostaty je hormonálně dependentní. Zjistil, že kastrace vede jak k atrofii prostaty, tak brzdí vývoj primárního nádoru a jeho metastáz. Dospěl také k názoru, že

stejný účinek mají i estrogeny a za tento objev, který se využívá v léčbě nádorů prostaty dodnes, dostal v roce 1966 Nobelovu cenu. [3]

V současnosti jsou nádorová onemocnění prostaty druhým nejrozšířenějším typem nádorových onemocnění a třetí nejčastější s nádorem spojenou příčinou smrti v mužské populaci západní Evropy. V České republice bývá ročně objeveno přes 5 000 nových případů nádorů prostaty a okolo 1500 mužů na tuto nemoc zemře. [4] ČR tedy patří k zemím s nejvyšší mortalitou⁴, stabilizovat tento nepříznivý vývoj úmrtnosti se daří, díky dokonalejším testům na její rozpoznání a účinnější léčbě, teprve v posledních letech. Incidence⁵ roste ročně asi o 2-3 %, za posledních 15 let se počet nahlášených nemocných ztrojnásobil (obr. č. 3). [5]



Obrázek č. 3 – Časový průběh hrubé incidence a mortality nádorových onemocnění prostaty v ČR,

zdroj: <http://www.svod.cz/report.php?diag=C61&type=pdf>

⁴ počet mrtvých na počet obyvatelstva

⁵ počet nemocných na počet obyvatelstva

Základní podmínkou pro zvýšení úspěšnosti léčby nádorů prostaty je jejich včasná detekce. Proto by měl každý muž po padesátém roce, i když nemá žádné problémy s močením, navštívit svého urologa a podstoupit preventivní urologické vyšetření. Muži s výskytem nádorových onemocnění v rodině a stejně tak muži afroamerického původu by měli začít s těmito preventivními vyšetřeními již od svých čtyřiceti let. Poté by ho měli muži navštěvovat pravidelně jednou za dva roky a po dovršení šedesáti let každoročně.

1.3. Vyšetření prostaty

V současné době neexistuje jeden konkrétní test, který by nám potvrdil či vyvrátil přítomnost nádoru prostaty a zároveň nás informoval o jeho pokročilosti a umístění. Jedná se tedy spíše o soubor vyšetření, která lze rozdělit na ta, která vedou k podezření na nádor prostaty (vyšetření per rectum a hladiny PSA), vyšetření, která jej histologicky potvrdí (transrektální sonografie s biopsií prostaty) a ostatní, která slouží k určení pokročilosti onemocnění (CT, scintigrafie apod.).^[2]

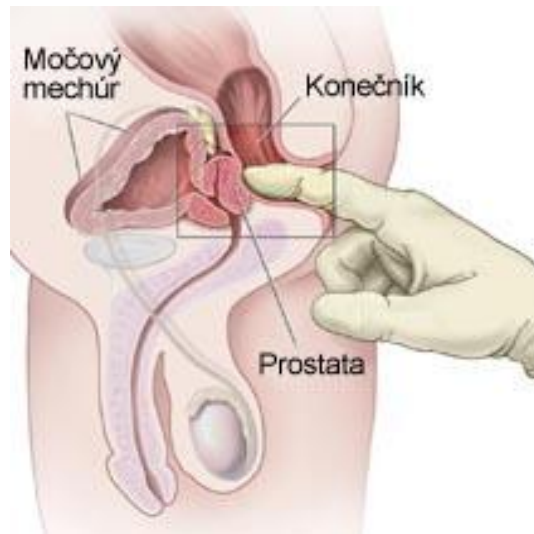
1.3.1. Vyšetření vedoucí ke stanovení diagnózy

Tato vyšetření, tedy vyšetření per rectum a hladiny PSA, vedou pouze k podezření na přítomnost nádorů prostaty.

1.3.1.1. Vyšetření per rectum (digitální rektální vyšetření)

Vyšetření per rectum by mělo být prováděno pravidelně u všech mužů starších padesáti let již u praktického lékaře. Jeho podstata spočívá v prohmatání zadní stěny prostaty. Lékař při vyšetření vsune prst do konečníku pacienta a přes zakončení tlustého střeva ohmatá prostatu (obr. č. 4). Jakákoliv odchylka od elasticity, hladkosti i měkkosti povrchu (uzliny, žmolky), symetrie, ohraničení žlázy či mobility rektální sliznice nasvědčuje přítomnosti karcinomu prostaty. Musíme si však uvědomit, že toto vyšetření umožní lékaři prohmatat pouze zadní stěnu prostaty, jen asi 1/3 povrchu této

žlázy. Vyskytuje-li se tedy nádor v přední části nebo ve středu prostaty může být výsledek rektálního vyšetření hodnocen jako normální. Abnormality při tomto vyšetření mohou způsobit i jiné problémy, např. současné nebo minulé infekce prostaty, dřívější biopsie, kameny v prostatě, a dokonce i benigní hyperplazie. Na druhou stranu tímto preventivním vyšetřením může zkušený lékař odhalit zcela asymptomatický nádor.



Obrázek č. 4 – Vyšetření per rectum,
zdroj: http://www.zdravaprostata.sk/wp-content/uploads/prostata_DRE.jpg

1.3.1.2. Test na zjištění hladiny PSA v krvi

Prostatický specifický antigen (PSA) je současný marker⁶ nádorových onemocnění prostaty. Slouží jak ke stanovení diagnózy, tak k určení pokročilosti choroby i monitoringu úspěšnosti léčby, avšak jeho senzitivita (49-91 %) a specifita (68-80 %) nejsou dostatečně vysoké, aby mohl být považován za ideální marker. ^[2]

Z chemického hlediska se jedná o glykoprotein, kódovaný na 19. chromozomu, podílející se na likvefakci⁷ spermií, jenž je vylučován epiteliálními buňkami prostaty, jak

⁶ látka vylučovaná nádorovými buňkami, která slouží k identifikaci nádoru

⁷ přeměna plynné látky do kapalného stavu

normálními, tak nádorovými. PSA se vyskytuje v krvi, z větší části (85 %) ve vazbě na bílkoviny krevní plazmy a zčásti jako volný, tzv. fPSA. Malé množství je do krevního oběhu uvolňováno stále, při podráždění nebo poškození prostaty uniká PSA větší množství. Zvýšená hladina PSA v krvi tedy signalizuje jakoukoliv abnormalitu prostaty, nejen nádor.

Jako normální množství PSA v krvi je obvykle považována koncentrace 0-4 ng/ml, některé druhy testu mají horní limit normálu již 2,5 ng/ml.^[6] Většina mužů s nádorem prostaty má hladinu PSA v rozmezí 10 až 20 ng/ml, avšak nejsou neobvyklé ani hodnoty v řádu stovek nebo dokonce tisíců. Takto vysoké hodnoty skoro vždy signalizují pokročilé nádorové onemocnění prostaty. Obecně tedy platí, že čím vyšší je hladina PSA, tím je vyšší pravděpodobnost přítomnosti nádoru prostaty a jeho rozšíření mimo tuto žlázu.

Pokud je hladina PSA v krvi pacienta mezi 4 až 10 ng/ml, v tzv. šedé zóně, je vhodné, pro přesnější stanovení diagnózy, určit poměr koncentrací volného PSA k celkovému, tzv. f/t PSA. Hodnoty nižší než 0,25 (25 % fPSA) signalizují vysokou pravděpodobnost výskytu nádoru prostaty, jelikož hladina volného PSA je u karcinomu prostaty, kvůli většímu narušení architektury tkáně, vyšší než u benigního zvětšení. Dalším upřesňujícím a v současnosti hojně používaným je test nazývaný PSA velocita, PSA-V, který porovnává individuální nárůst hladiny PSA za určité časové období, nejčastěji za rok. K přesnému určení však stačí pouze tři hodnoty PSA v časovém rozmezí minimálně 18 měsíců. V minulosti se za znepokojující považovala hodnota přesahující 0,75 ng/ml/rok, ale v současnosti se tato hodnota snižuje a již nárůst 0,5 ng/ml/rok může znamenat výrazné riziko přítomnosti nádoru prostaty v těle.^[7]

Jak už bylo výše uvedeno, specifita PSA není příliš vysoká a hladina PSA v krvi bývá ovlivňována mnoha faktory. Asi největší vliv na množství produkovaného PSA má zvyšování věku (tab. č. 1), v jehož důsledku se většinou zvětšuje objem prostaty, ať už kvůli přítomnosti nádorového onemocnění či pouhé benigní hyperplazie, a tím i množství buněk, které PSA produkují. Hladina PSA by měla u mužů kolem padesátky dosahovat hladiny do 3ng/ml, poté se v každém desetiletí zvyšuje zhruba o 1 ng/ml,

pro muže ve věku 60 až 70 let může být tedy normální hladina až 6,5ng/ml.^[7] Mezi další ovlivňující faktory, nesouvisející s karcinomem, patří záněty nebo infekce prostaty či močového měchýře, kameny v prostatě nebo nedávné operace prostaty.

S jistotou se nedá ani říci, že když je hladina PSA v normálu, nemá pacient v těle nádor prostaty a naopak. Až 20 % mužů s karcinomem prostaty má hodnotu PSA nižší než 4 ng/ml.^[8] Jsou známy případy, kdy hladina PSA byla 1,7 ng/ml a dotyčný měl přitom pokročilý karcinom prostaty, kdy pacient měl celý svůj život hladinu PSA 20 ng/ml nebo kdy pouhá infekce zvýšila údaj o PSA na 60 ng/ml a díky léčbě se hladina po pár měsících vrátila k normálu.^[6]

| věk (roky) | hodnota PSA (mg/ml) | věk (roky) | hodnota PSA (mg/ml) | věk (roky) | hodnota PSA (mg/ml) |
|------------|---------------------|------------|---------------------|------------|---------------------|
| 35 - 45 | 1,79 | 40 - 50 | 1,81 | 40 - 49 | < 2,3 |
| 45 - 55 | 2,93 | 50 - 60 | 3,36 | 50 - 59 | < 3,5 |
| 55 - 60 | 4,69 | 60 - 70 | 4,33 | 60 - 69 | < 4, 9 |
| 65 -75 | 5,62 | 70 - 80 | 6,16 | 70 - 79 | < 5,6 |

Tabulka č. 1 – Referenční hodnoty PSA vztažené k věku od různých autorů, vytvořeno podle <http://www.rochediagnostics.cz/download/la/0204/nadorove.pdf>

Tento test je tedy v současné době cenným vodítkem při stanovení diagnózy nádorových onemocnění prostaty, může být včasným indikátorem karcinomu prostaty, ještě před změnami zjistitelnými rektálním vyšetřením, ale nemůžeme se na něj stoprocentně spolehnout. A při podezření na přítomnost nádoru prostaty musí být provedena ještě další vyšetření. Největší využití má tento test až při samotné léčbě, kdy s jeho pomocí mohou lékaři monitorovat celý její průběh.

1.3.1.3. Kyselá prostatická fosfatáza (ACPP)

Test na kyselou prostatickou fosfatázu, nazývaný PAP, může sloužit jako doplňkový marker. Patřil mezi původní metody sloužící ke zjišťování výskytu nádorů. Byl to jeden z nejlepších testů, výsledky však byly často dosti rozdílné, nepřesné a klamné. Nyní je používán dosti zřídka, většinou jen v případech, kdy je podezření na rozšíření karcinomu mimo prostatu.

1.3.1.4. Další markery

Existuje mnoho dalších látek, které by mohli potenciálně sloužit jako markery nádorů prostaty, ale jsou zatím pouze v experimentálním stádiu.

V roce 2009 tým vedený patologem a urologem Arulem Chinnaiyanem z Michiganské univerzity analyzoval složení 262 vzorků tkáně, krve a moči. Vědci prověřili 1126 látek, které by mohly v budoucnu sloužit jako spolehlivější markery nádorů prostaty. Pouze šest metabolitů bylo přítomno ve všech fázích vývoje této nemoci. Nejvíce vynikala látka sarkosin, jejíž množství se úměrně zvyšovalo s pokročilostí nádoru. Tato látka se vyskytovala v 79 % vzorků moči odebraných mužům s metastazujícími nádorovými onemocněními prostaty a v 42 % vzorků moči mužů s raným stádiem nádoru prostaty. Dalším důvodem, proč by mohla tato látka v budoucnu sloužit jako marker nádorových onemocnění prostaty, je fakt, že se ve vzorcích moči odebraných mužům bez karcinomu prostaty nevyskytovala.^[9]

| Diagnostické markery: | Prognostické markery: | Diagnostické i prognostické markery: |
|------------------------------|------------------------------|---|
| A2M | Akt-1 | PSA |
| DD3/PCA3 | FADD | PIM-1 |
| GSTP-1 | KLK2 | AMACR |

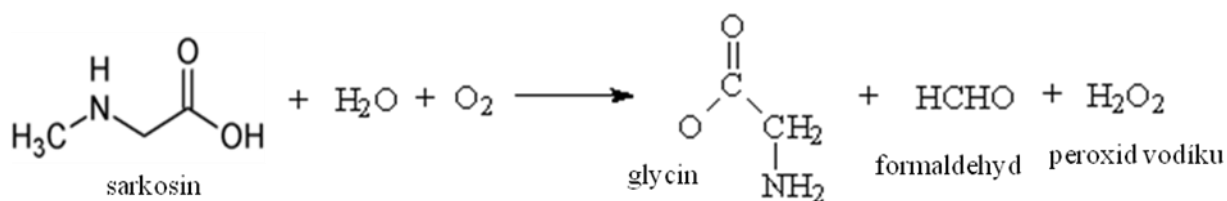
Tabulka č. 2 – Některé markery karcinomu prostaty z celkem 91 potenciálních markerů zveřejněné v roce 2004 v článku Detection of Prostate Cancer and Predicting Progression Current and Future Diagnostic Markers, James V. Tricoli at el.

1.3.2. Sarkosin

Jednou z látek, jejichž potenciál pro využití v diagnostice nádorů prostaty je v současnosti v centru zájmu, je sarkosin.

Sarkosin, $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{COOH}$, byl poprvé izolován a pojmenován německým chemikem Justusem von Liebigem v roce 1847. Je to přírodní, netoxická, bezbarvá pevná látka patřící do skupiny aminokyselin, jenž má sladkou chuť a je rozpustná ve vodě. V lidském těle vzniká jako meziprodukt metabolismu cholinu na glycin, je to tedy methylderivát glycinu, někdy nazývaný N-methylglycin (obr. č. 5). V malém množství se vyskytuje ve svalech i jiných tělních tkáních.

V současnosti se používá v kombinaci s jinými antipsychotiky k léčbě schizofrenie a depresí, nejčastěji v dávce 2 g za den, dále je obsažen v protinádorovém antibiotiku aktinomycinu D. ^[10]



Obrázek č. 5 – Metabolismus sarkosinu na glycin, upraveno podle http://www.peta.unas.cz/biosenzory/Biosenzory_soubory/sarkosin_soubory/image002.gif

1.3.3. Vyšetření k potvrzení nádoru prostaty

Jak už bylo výše uvedeno, rektální vyšetření ani krevní test na PSA nejsou stoprocentní, proto se při podezření na přítomnost nádoru prostaty provádí spolehlivější, avšak nepříjemnější vyšetření, která nádor histologicky potvrdí či vyvrátí - sonografie s biopsií prostaty.

1.3.3.1. Transrektální ultrasonografie prostaty

První metoda, prováděná při lékařsky potvrzeném podezření na karcinom prostaty, spočívá v zavedení ultrazvukové sondy přes rektální otvor co nejbližší k prostatě. Sonda, opatřena bioptickým naváděčem, vysílá ultrazvukové vlny s vysokou frekvencí (nejčastěji 7,5 MHz ^[6]), které se postupně odráží od okolní tkáně. Odražené vlny jsou toutéž sondou opět zachycovány. Na základě toho, že odlišné tkáně odráží ultrazvukové vlny jinak, získá lékař trojrozměrný obraz celé prostaty i okolí a tím i polohu případného nádorového ložiska (to bývá většinou hypoechogení, 40 % izoechogení ^[2]). Takto zaváděná sonda bývá často opatřena kanálem nebo přídatným nástavcem pro biopsii.

1.3.3.2. Biopsie prostaty

Biopsie prostaty spočívá v odebrání malých kousků tkáně prostaty pro mikroskopickou analýzu. Odběr tkáně bývá zpravidla prováděn speciální bioptickou jehlou hned po transrektální ultrasonografii s pomocí již umístěné sondy, díky které se určí přesná místa odběru tkáně. Jehla poté provede odběr tkáně již sama, počet odběrů se může lišit podle velikosti prostaty, v současnosti se odebírání nejméně deset vzorků tkáně. Celé vyšetření trvá zhruba 15 minut, nemělo by být nijak bolestivé, může být spíše nepříjemné s následným drobným krvácením, trvajícím až několik týdnů. ^[4] Občas nastanou komplikace v podobě silnějšího krvácení v moči, stolici či spermatu nebo mírného zvýšení teploty. Aby nedošlo k infekci, jsou preventivně, ráno ještě před zákrokem i po zákroku, podávána antibiotika. Vzorky tkáně odebrané při biopsii slouží k identifikaci nádorových buněk. Při potvrzení přítomnosti karcinomu se z těchto vzorků stanoví i stupeň pokročilosti nemoci.

Přesto, že je při biopsii odebráno větší množství vzorků, zhruba u 15 % případů dochází k odebrání pouze tkáně nepostížené nádorovým onemocněním, která je následně vyhodnocena jako zdravá. ^[6]

V případě patologického potvrzení nádoru prostaty je, ještě před zahájením léčby, důležité určit stádium nemoci, a zda se již rozšířila ven z prostaty.

1.3.4. Vyšetření k potvrzení rozšíření nádoru mimo prostatu

V pokročilejším stádiu nádorů prostaty, zpravidla u pacientů s koncentrací PSA nad 10 ng/ml, začnou prostatické nádorové buňky metastazovat krevní nebo lymfatickou cestou do okolí. Nejčastějším místem vzdálených metastáz karcinomu prostaty je skelet, konkrétně pánevní kost, páteř a žebra. Tyto kostní metastázy se vyskytují zhruba u 80 % pacientů s pokročilým stádiem nádoru prostaty. ^[1]

1.3.4.1. Scan skeletu (scintigrafie)

Scan skeletu je dnes nejcitlivější dostupnou metodou k identifikaci rozšíření nádorových onemocnění do kostí. Při této nukleární lékařské technice jsou do těla pacienta injektovány malé kousky radioaktivní látky. Látka pak krevním oběhem cirkuluje po celém těle, kde je postupně, zhruba po dobu jedné hodiny, absorbována kostmi. Speciální detekční zařízení, tzv. scintilační kamera, pak zachycuje po dobu zhruba 30 až 45 minut gama záření vysílané atomy radioaktivní látky v těle. Takto vytvořené snímky zobrazují oblasti rychlého růstu kostí.

1.3.4.2. CT vyšetření (výpočetní tomografie)

Tato bezbolestná a neinvazivní radiologická vyšetřovací metoda umožňuje lékaři prohlédnout si všechny vnitřní orgány lidského těla s pomocí počítačově zpracovaných klasických rentgenových snímků.

Při vyšetření břišní dutiny, tedy i prostaty, musí pacient nejprve na lačno vypít tekutinu s kontrastní látkou. Pro usnadnění identifikace cév a vnitřních struktur se může tato kontrastní barva zavést také nitrožilně. Po dvou hodinách od podání kontrastní látky je pacient připraven na vyšetření CT přístrojem. Samotné vyšetření trvá 10 až 20 minut, během nichž přístroj generuje několik set rentgenových obrazů z různých úhlů pohledu. Lékař tak získá plošné řezy vyšetřovaného objektu. Některé pokročilejší systémy již umí vytvořit i trojrozměrný obraz sledovaného objektu.

2. Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat metodu pro rychlé a spolehlivé stanovení sarkosinu v různých biologických vzorcích.

Zkoumat vliv přísadků zinku na životnost nádorových prostatických buněk i hladinu sarkosinu.

Analyzovat hladinu sarkosinu a další biologické parametry ve vzorcích moči kontrolní skupině zdravých mužů a současným i vyléčeným pacientů s nádory prostaty.

Experimentální část

3. Materiály a metody

3.1. Materiály

3.1.1. Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, spol. s.r.o. ve standardní p.a. čistotě. Pro přípravu všech roztoků byla použita destil. voda Milli-Q.

Pro Analyzátor aminokyselin AA 400 bylo použito 6 pracovních roztoků (tab. č. 3).

| | ředící pufr | pufr č. 1 | pufr č. 2 | pufr č. 3 | pufr č. 4 | NaOH |
|---------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| pH | 2,2 | 2,7 | 3 | 4,25 | 9,7 | 14 |
| kys. citronová (g) | 14 | 11,11 | 10 | 7,53 | - | - |
| citronan sodný (g) | - | 4,04 | 5,6 | 9,06 | - | - |
| chlorid sodný(g) | 11,5 | 9,25 | 8,36 | 18 | 52,6 | - |
| kys. boritá (g) | - | - | - | - | 2,05 | - |
| azid sodný (g) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - |
| thiodiglykol (ml) | 5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | - |
| hydroxid sodný (g) | - | - | - | - | - | 8 |

Tabulka č. 3 – Sodno – citrátové pufrы pro Analyzátor aminokyselin AAA 400 (na 1000 ml)

Pro Beckman PACE 5510 byl použit jako elektrolyt 50 mM CuSO₄ s hodnotou pH 3,8.

Pro spektrofotometr BS – 400 byly použity standardní reagenty od firmy Greiner – Diagnostic.

3.1.2. Biologické vzorky

3.1.2.1. Buněčné lyzáty

Pro analýzu sarkosinu byly použity buněčné lyzáty nádorových prostatických buněk linie 22Rv1 (odvozená z xenograftu⁸ pasážovaného na kastrovaných myších) připravených v laboratořích lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Buňky byly pěstovány v živném médiu RPMI-1640 obohaceném o 10% FBS⁹ a antibiotika (penicilin, streptomycin). Uchovávány byly v Termoboxu při teplotě 37 °C s 5% přísunem CO₂. Po prvním dosažení 50 až 60% konfluency došlo k výměně média. Po zhruba 24 hodinách bylo médium opět vyměněno, tentokrát však bylo nové médium obohaceno o 50, 150 a 300 μM zinek (ZnSO₄), díky tomu tedy vznikly 3 odlišné vzorky buněk. Zhruba za 72 hodin od tohoto rozdělení došlo k 80 – 90% konfluenci a buňky již byly připraveny k závěrečnému sklizení.

Zinek je velmi významný biogenní prvek, avšak jeho zvýšené množství působí toxicky. Prostatická tkáň je v metabolismu zinku velmi specifická, její buňky akumulují až 10 násobně větší množství tohoto prvku. Nyní se uvažuje o využití zinku v diagnostice nádorů prostaty.^[11]

3.1.2.2. Vzorky moči

Pro analýzu sarkosinu i jiných biochemických parametrů bylo použito celkem 37 vzorků mužské moči; 26 vzorků tvořilo kontrolní skupinu - 23 zdravých dobrovolníků ve věku 17–31 let a 3 vyléčení pacienti s karcinomem prostaty (muži u nichž byl karcinom prostaty v minulosti potvrzen, ale po podstoupení léčby se v jejich těle, podle v současnosti používaných testů, již nevyskytuje) - a 11 pacientů s nádory prostaty z Urologické kliniky FN u sv. Anny.

Všechny biologické vzorky byly použity se souhlasem etické komise FN u sv. Anny.

⁸ štěp pocházející z jiného živočišného druhu, v tomto případě z lidského karcinomu prostaty

⁹ fetální hovězí sérum, vysoký obsah embryonálních faktorů podporujících růst

3.2. Metody

3.2.1. HPLC

Technika HPLC zaujímá mezi chromatografickými metodami velmi významné místo. Všeobecně užívaná zkratka je odvozena od anglického názvu „high-performance liquid chromatography“, v překladu vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Přístroj, na kterém se metoda HPLC provádí, se obecně nazývá kapalinový chromatogram, v našem případě byl použit Analyzátor aminokyselin AAA 400 (obr. č 6). V současnosti existuje více typů kapalinové chromatografie s rozdílnými principy separace i následné analýzy vzorku.

K detekci sarkosinu byla použita ionexová kapalinová chromatografie s fotometrickým detektorem. Mobilní fázi tvořily sodno-citrátové pufrы (viz. Chemikálie). Stacionární fázi byl ionex¹⁰, konkrétně ionex s kyselou funkční skupinou HSO_3^- .

K separaci vzorku dochází na koloně naplněné ionexem. Kladně nabitá aminoskupina aminokyselin se reverzibilně adsorbuje na záporně nabitou sulfoskupinu. Změnou podmínek, většinou pH, iontové síly a teploty, dochází k postupnému oddělování složek směsí. Jako první se z kolony vymývají aminokyseliny s nejnižším isoelektrickým bodem¹¹, tedy ty nejméně kyselé. Postupným zapojováním méně kyselých a více koncentrovaných pufrů dochází k postupnému oddělení všech složek vzorku. Rovnoměrnému vymývání z kolony dopomáhá zvýšení teploty tam, kde by byla mezera mezi jednotlivými aminokyselinami opouštějícími kolonu příliš velká. Po eluci aminokyselin příslušného vzorku následuje regenerace kolony pomocí promývání roztokem 0,2 M NaOH.

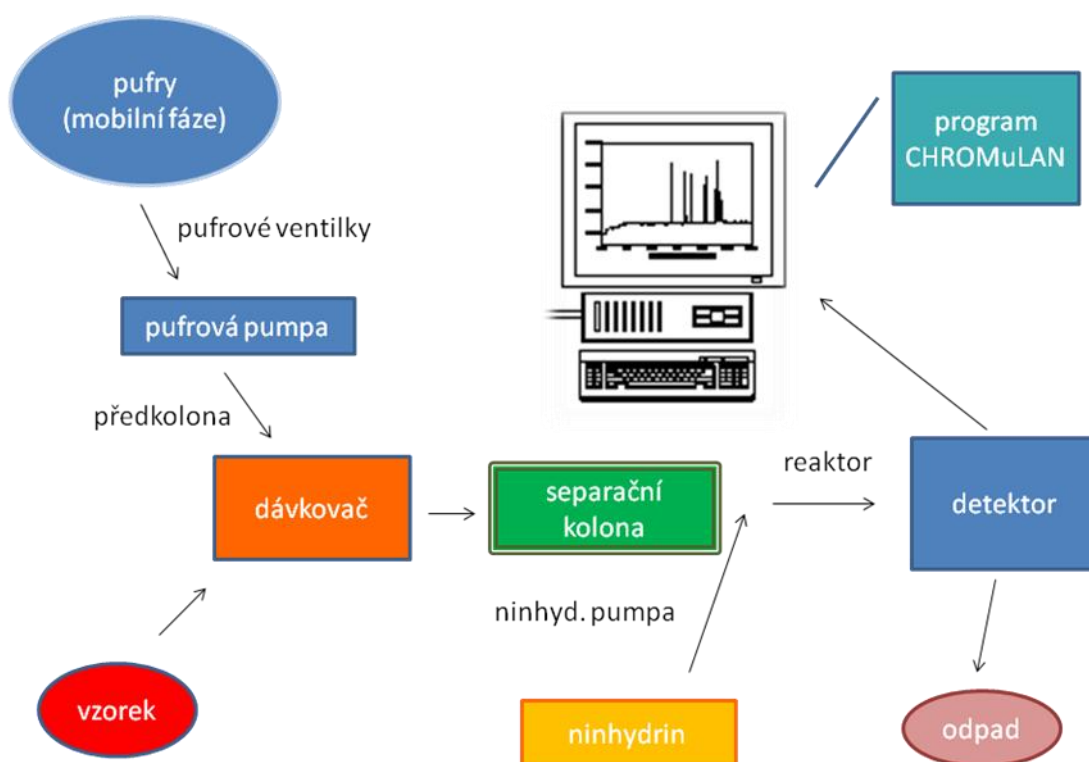
Po výstupu z kolony jsou již oddělené aminokyseliny míseny s ninhydrinovým činidlem, se kterým následně při zvýšené teplotě reagují v průtočném reaktoru. Tento proces se nazývá post-kolonová derivatizace (obr. č. 7). Po výstupu z reaktoru je vzniklý barevný produkt reakce, v případě sarkosinu purpurově zbarvený komplex, tzv.

¹⁰ iontoměnič

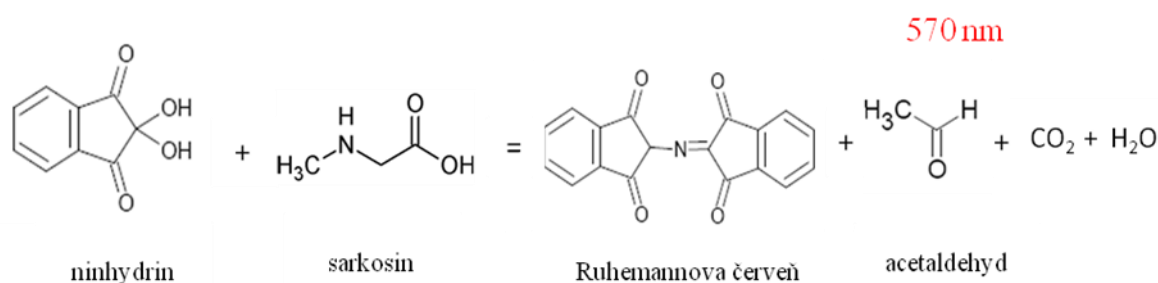
¹¹ tj. hodnota pH, při níž má daná aminokyselina nulový elektrický náboj, vyskytuje-li se v prostředí s vyšším pH je nabitá záporně

Ruhemannova červeň, detekován pomocí absorpčního fotometrického detektoru. Detektor detekuje změnu absorpance při dvou vlnových délkách, v případě sarkosinu při vlnové délce 570 nm.

Počítačovým programem CHROMuLAN vytvořený záznam, chromatogram, představuje závislost absorpance na čase. Tento záznam je tvořen elučními křivkami, píky, jejichž poloha určuje konkrétní aminokyselinu a jejich plocha pak absorpanci barevného produktu, která je přímo úměrná koncentraci detekované aminokyseliny.



Obrázek č. 6 – Schéma kapalinového chromatogramu AAA 400



Obrázek č. 7 – Post-kolonová derivatizace sarkosinu

3.2.2. CE

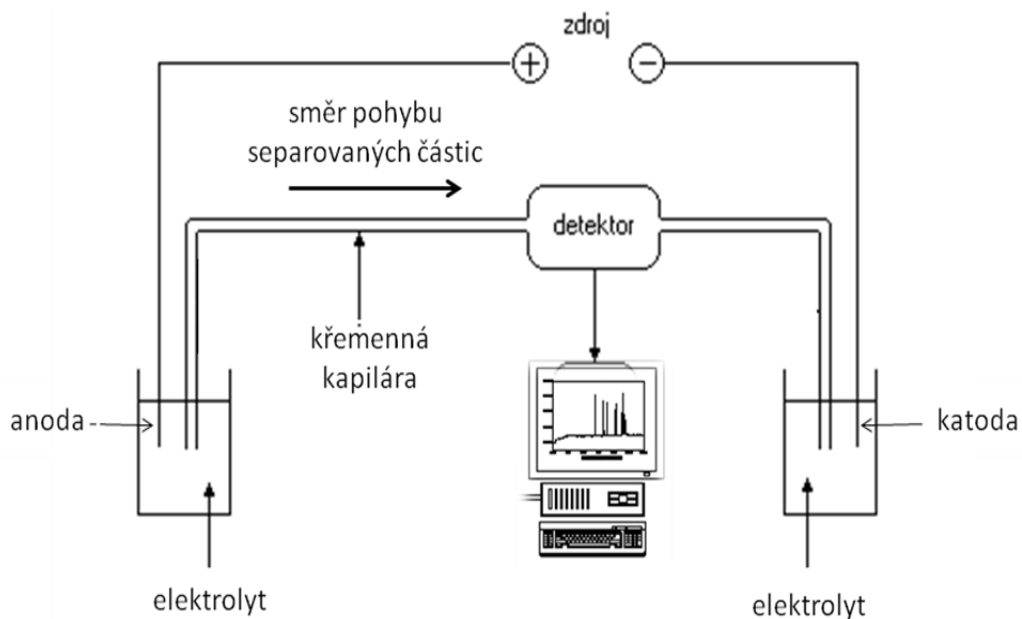
CE patří spolu s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) v analytické chemii k nejdůležitějším separačním metodám. Všeobecně užívaná zkratka je odvozena od anglického názvu „capillary electrophoresis“, v překladu kapilární elektroforéza. Mezi přednosti této metody patří především rychlá a účinná separace s nízkou spotřebou vzorků i chemikálií. Principem separace je využití odlišné pohyblivosti nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. K analýze separovaných látek, stejně jakou u HPLC, slouží fotometrický či fluorescenční detektor. CE je prováděna na stejnojmenném přístroji, v našem případě byl použit přístroj Beckman PACE 5510 (obr. č. 8).

Při kapilární elektroforéze probíhá dělení látek v nepokryté křemenné kapiláře, trubičce délky 57 cm (50 cm – délka k detektoru) o vnitřním průměru $50\ \mu\text{m}$ ¹², do níž je analyzovaný vzorek, pomocí tlaku 3,4 kPa, umístěn. Naplněná kapilára je ponořena každým koncem do elektrolytu¹³ v oddělených nádobách s elektrodami. Elektrodám je následně dodáno vysoké stejnosměrné napětí 15 kV. V důsledku průchodu elektrického proudu kapilárou naplněnou elektrolytem dochází na její vnitřní straně v neutrálním až alkalickém prostředí pufru k ionizaci silanových skupin, v důsledku čehož se vnitřní povrch kapiláry nabije záporně. Na záporně nabitý povrch kapiláry se navážou opačně nabité ionty, tím se vytvoří elektrická dvojvrstva. Kladně nabitá vnitřní vrstva se začne pohybovat směrem ke katodě a strhne s sebou veškerý elektrolyt, tím vzniká tzv. elektroosmotický tok. Směs látek v kapiláře se v důsledku různé pohyblivosti v elektrickém poli začne dělit. Nejrychleji se ke katodě přiblíží kladně nabité částice, neutrální částice se pohybují stejnou rychlostí jako elektroosmotický tok, nejpozději se ke katodě dostanou anionty (obr. č. 9). Jednotlivě separované části vzorku putují přes fotometrický detektor, jenž sleduje absorpci ultrafialového záření o vlnové délce v rozmezí 200 – 280 nm. Vzhledem k absenci chromoforu ve struktuře většiny aminokyselin, i sarkosinu, je nutné, stejně jako u HPLC, provádět jejich derivatizaci

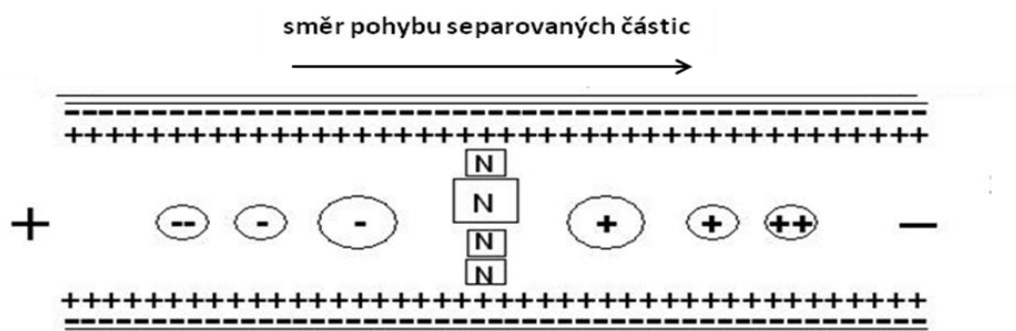
¹² díky tak malému vnitřnímu průměru kapiláry je zabráněno promísení separovaných částic difuzí

¹³ roztok kyseliny, zásady nebo soli, který vede elektrický proud

nebo zvolit metodu nepřímé detekce. Alternativní variantou je využití chelatace¹⁴ pomocí ionů mědi (CuSO_4), čímž vznikne komplex absorbující záření o vlnové délce 254 nm. K detekci sarkosinu byl využit právě tento způsob. Výsledný záznam závislosti absorpance na čase se nazývá elektroferogram. Tento záznam je tvořen řadou píků, jejichž migrační čas, stejně jako u HPLC, určuje typ separované složky a výška, resp. plocha, určuje koncentraci dané látky.



Obrázek č. 8 – Schéma kapilární elektroforézy



Obrázek č. 9 – Schéma pohybu různě nabitých částic křemennou kapilárou; nejrychleji se pohybují malé kationty, neutrální částice se pohybují stejnou rychlostí jako elektrolyt, nejpozději se ke katodě dostanou nejmenší anionty s největším záporným nábojem, upraveno podle:

<http://www.doping.chuv.ch/en/lad-ec-zone-eng.jpg>

¹⁴ fyzikálně chemický proces, při němž některé organické sloučeniny váží vícevazebné kationty (obvykle kovy)

3.2.3. Spektrofotometrie

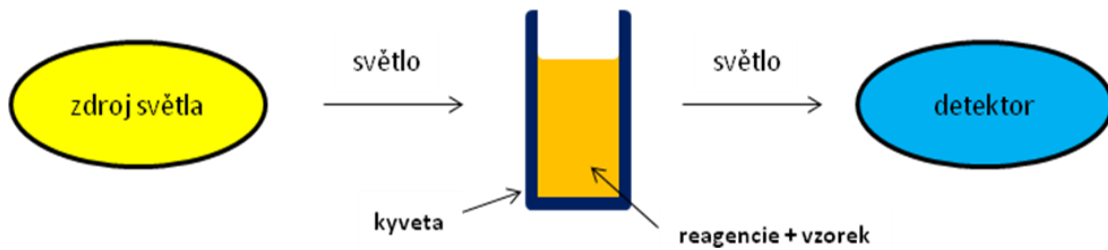
Spektrofotometrie je jednou z nejpoužívanějších biochemických metod sloužících ke stanovení koncentrace látek pomocí různé absorpance elektromagnetického záření, v určitém souvislém rozsahu vlnových délek, daných vzorků. Mezi přednosti této metody patří přesnost, citlivost a velké spektrum detekovaných látek. Přístroj sloužící k měření absorpance pomocí této metody se nazývá spektrofotometr. Pro stanovení biochemických parametrů ze vzorků moči byl použit automatický spektrofotometr BS - 400 (obr. č. 10).

Měření absorpance pomocí této metody probíhá v plastových kyvetách¹⁵. Do kyvety je nejprve robotickým ramenem opatřeným dávkovací jehlou umístěno 200 μ l reagencie, pro každou detekovanou látku specifický typ, z reagenčního prostoru temperovaného na 4 ± 1 °C. Po 4 minutách, během nichž se reagencie inkubuje na teplotu kyvetového prostoru 37 ± 0.1 °C, je do kyvety umístěno 20 μ l vzorku. Následně jsou tyto dvě látky promíchány. Takto vzniklé barevné komplexy jsou pro každou látku specifické a detekovatelné při různé vlnové délce.

Bílkoviny reagují se svojí reagenčí, konkrétně s Coomassie činidlem, za vzniku barevného komplexu detekovatelného při vlnové délce 570 nm, jehož intenzita, stejně jako u ostatních látek, je úměrná koncentraci bílkoviny v daném vzorku. U ostatních biochemických parametrů probíhá detekce na základě enzymatických stanovení. V případě močoviny dochází ke vzniku komplexu GLDH – glutamátdehydrogenázy, detekovatelného při vlnové délce 578 nm, díky reakci s ureázou. Kyselina močová reaguje s urikázou za vzniku TBHBA – 2,4,6-tribrom-3-hydroxybenzoové kyseliny detekovatelné při vlnové délce 546 nm. K detekci glukózy, při vlnové délce 505 nm, slouží její barevný komplex G-6-PDH = glukózo-6-fosfátdehydrogenáza vznikající při reakci glukózy s HK a následně s G-6-PDH. Kreatinin reaguje s alkalickým pikrátem za vzniku komplexu detekovatelného při 505 nm. Výsledná hodnota absorpance detekované látky je rovna rozdílu hodnoty absorpance její reagencie a hodnoty absorpance jejího komplexu po 10 minutové inkubaci. S pomocí takto získané hodnoty

¹⁵ drobná labor. nádoba sloužící k měření optických vlastností roztoků

absorbance a hodnot kalibrační křivky je možno určit koncentraci měřené látky ve vzorku.



Obrázek č. 10 – Schéma principu spektrofotometru

Ke stanovení koncentrace iontů je používána metoda nepřímé potenciometrie, v tomto případě s využitím iontově selektivních elektrod, které jsou součástí spektrofotometru BS - 400. Tato metoda využívá k detekci koncentrace látek změny hodnoty elektromotorického napětí¹⁶ článku, skládajícího se z měrné a referenční elektrody.

¹⁶ napětí mezi póly nezátíženého zdroje

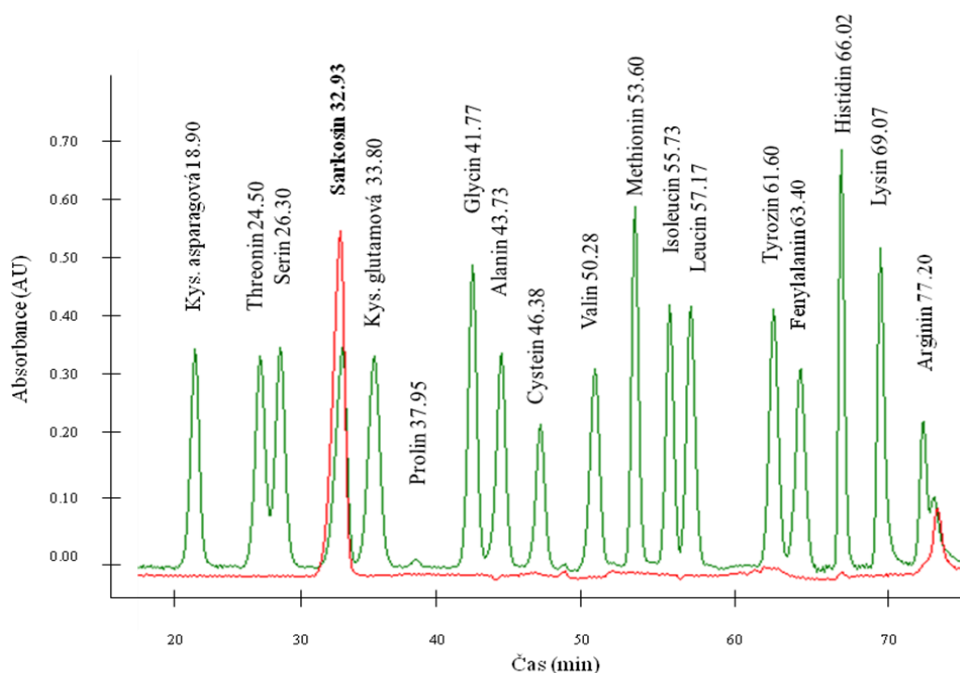
4. Výsledky a diskuze

4.1. Analýza standardních roztoků sarkosinu

4.1.1. HPLC

Přístroj AAA 400 je primárně optimalizován pro analýzu esenciálních aminokyselin v biologických vzorcích. Metoda poskytuje vysokou separační účinnost a reprodukovatelnost¹⁷ stanovení (RSD¹⁸ = 2 %). Jedním z prvních úkolů práce bylo ověřit, zda je tento přístroj vhodný pro stanovení sarkosinu, pro které není specificky určen.

Na obr. č. 11 je chromatogram standardní směsi 17 aminokyselin, která byla obohacena o sarkosin pro stanovení retenčního času a také pro vyloučení možné koeluce s jinou aminokyselinou. Z obrázku je patrné, že jsou podmínky separace nastaveny tak, aby došlo k úplnému rozdělení píku sarkosinu a nejbližšího sousedního píku – kys. glutamové. Červeně je proložen chromatogram samotného sarkosinu o koncentraci 1 mM. Migrační čas signálu sarkosinu je 31 minut.

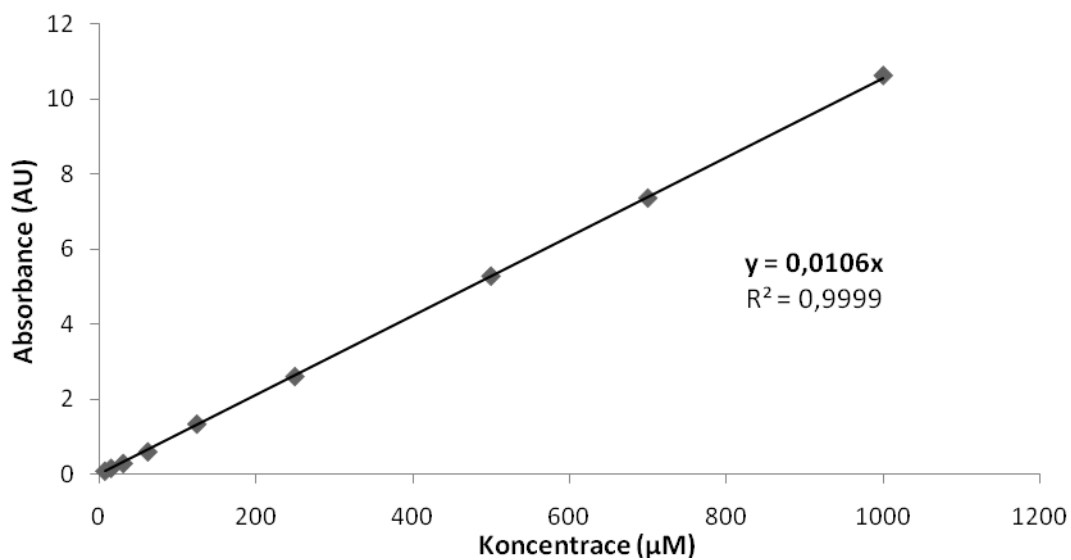


Obrázek č. 11 – Záznam chromatogramu směšného standardu aminokyselin proložený se záznamem 1000 μ M sarkosinu

¹⁷ stabilita metody a jejího provádění během celé doby používání

¹⁸ relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti

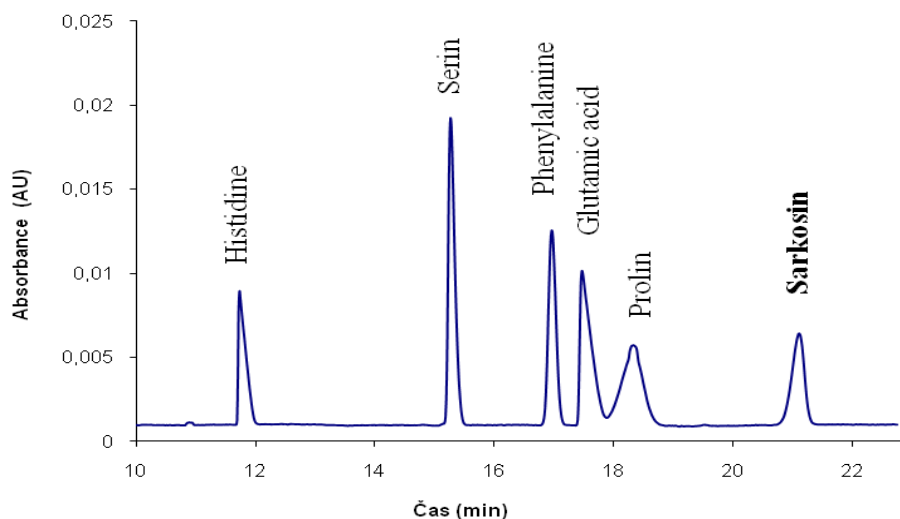
Dále byly měřeny vzorky čistého krystalického sarkosinu rozpuštěného ve vodě o různé koncentraci, na základě jejichž absorbance byla sestavena kalibrační křivka (obr. č. 12). Linearita kalibrace vyjádřená hodnotou $R^2 = 0.9999$ potvrzuje, že zvolená metoda vykazuje optimální odezvu detektoru v závislosti na koncentraci analytu.



Obrázek č. 12 – Kalibrační křivka sarkosinu z HPLC

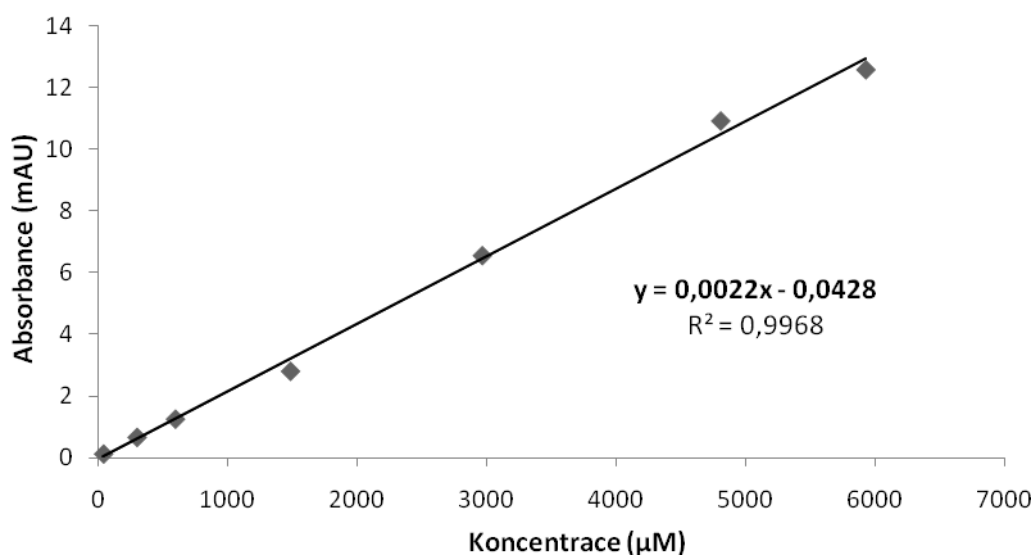
4.1.2. CE

Ověření této metody bylo provedeno, stejně jako u HPLC, pomocí separace standardní směsi aminokyselin včetně sarkosinu (obr. č. 13).



Obrázek č. 13 – Elektroferogram směšného standardu aminokyselin

Pro ověření odezvy detektoru byla sestrojena kalibrační křivka (obr. č. 14), která ukazuje linearitu na úrovni $R^2 = 0,9968$. Limit detekce metody je v řádech jednotek μM .



Obrázek č. 14 – Kalibrační křivka sarkosinu z CE

4.2. Analýza buněčných lyzátů

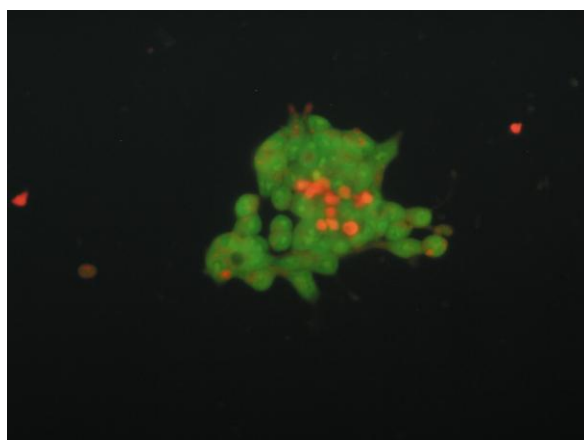
4.2.1. Vliv zinku na nádorové prostatické buňky

Současně s hladinou sarkosinu byl u nádorových prostatických buněk zkoumán vliv přídavků zinku na životnost těchto buněk. Na obr. č. 15 jsou zobrazeny buňky bez přídavku zinku. Na obr. č. 16 jsou buňky, jejichž živné médium bylo obohaceno o 75 a 750 μM zinek. Všechny detekované buňky byly, pro lepší viditelnosti, obarveny propidium jodidem s fluoresceindiacetátem a sledovány fluorescenčním mikroskopem při 400 násobném zvětšení. Červená barva buněk, nejvíce patrná u buněk s nejvyšší koncentrací přidaného zinku, při tomto typu obarvení, signalizuje mrtvé buňky. Z fotografií je tedy patrné, že se zvyšující se hodnotou přídavku zinku klesá životaschopnost nádorových prostatických buněk.

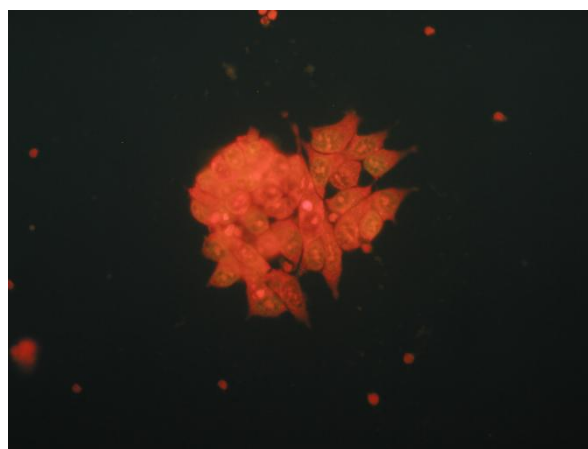
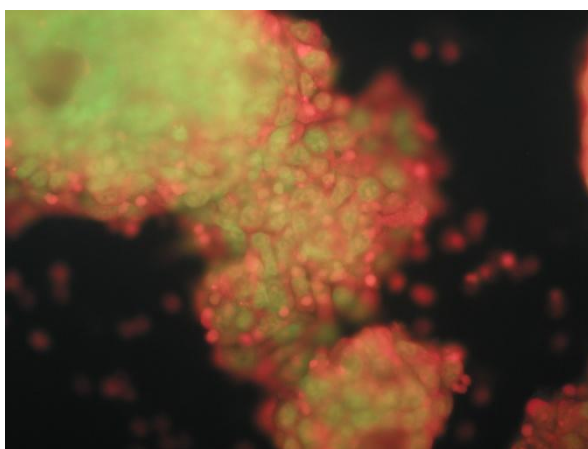
U zdravých prostatických buněk linie PNT1A docházelo k buněčné smrti již u 5 násobně nižší koncentrace přidaného zinku, což je zajímavé, jelikož nádorové buňky podléhají zpravidla účinkům cizorodým látek snadněji. Nádorově změněné prostatické buňky mají tedy utlumený mechanismus importu zinku, čehož by se mohlo v budoucnu využít v diagnostice nádorů prostaty.^[12]

4.2.2. Příprava buněčných lyzátů

Po sklizení byly nádorové prostatické buňky mechanicky homogenizovány ručním homogenizátorem v 50 μl fosfátovém pufru (pH 7,4) po dobu 3 minuty. Poté byly roztoky doplněny do 200 μl PBS a tepelně denaturovány při 99 °C po dobu 15 minut. Následně byly centrifugovány při 14 000 otáčkách a 4 °C po dobu 30 minut. Takto připravené tepelné lyzáty byly připraveny pro analýzu.



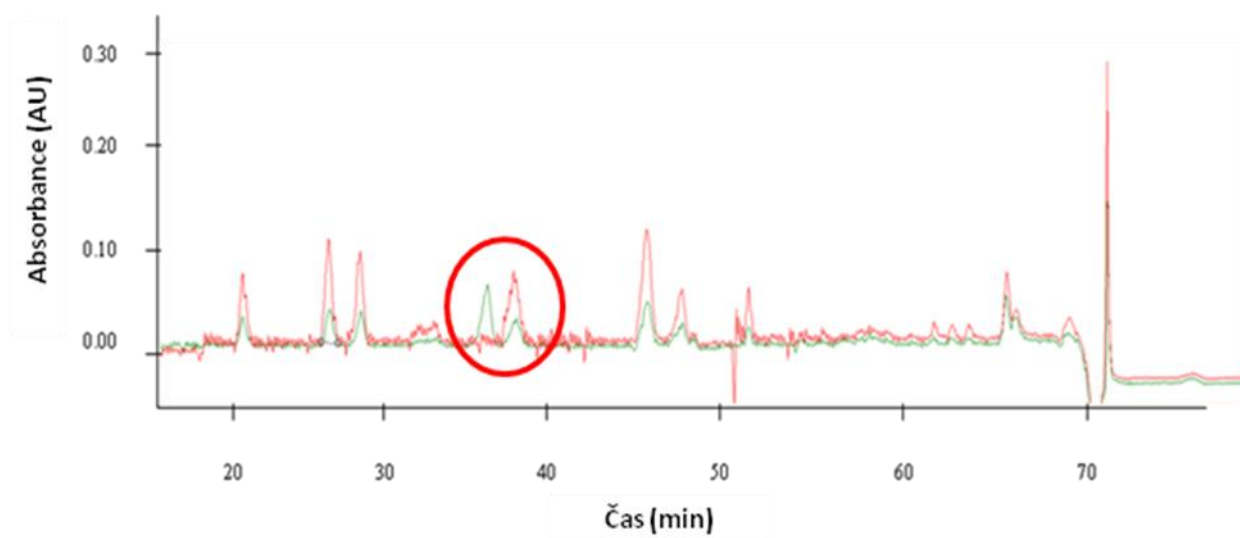
Obrázek č. 15 – Nádorové prostatické buňky linie 22Rv1 obarvené propidium jodidem s fluoresceindiacetátem, zvětšeno 400x



Obrázek č. 16 – Nádorové prostatické buňky linie 22Rv1 s 75 μM (vlevo) a 750 μM (vpravo) přidavkem zinku, obarvené propidium jodidem s fluoresceindiacetátem, zvětšeno 400x

4.2.3. HPLC

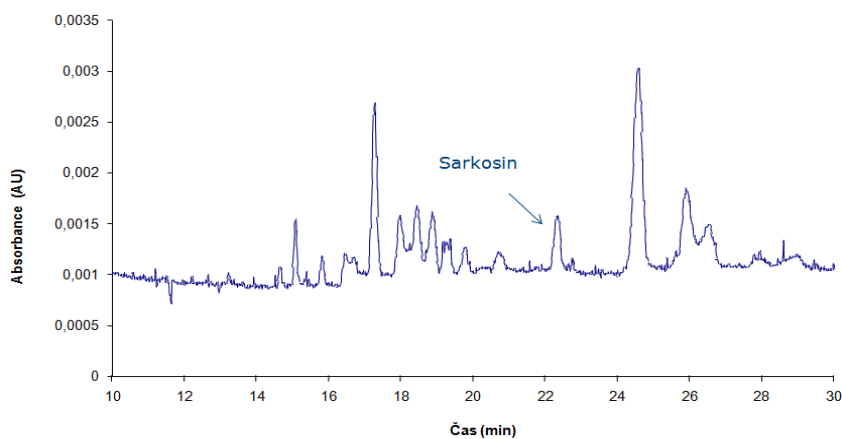
Připravené buněčné lyzáty byly ředěny ředícím pufrům v poměru 1:4 a podrobeny analýze pomocí HPLC. Analýza reálných vzorků je spojena se změnou v migračním čase způsobenou vlivem matrice. Z toho důvodu je pro identifikaci látek v reálných vzorcích používána tzv. metoda standardního přídávku. Na obr. č. 17 je chromatogram buněčného lyzátu ředěného ředícím pufrům (červená křivka) proložený s chromatogramem buněčného lyzátu, ke kterému byl kromě ředícího pufru přidán ještě standardní roztok 500 μ M sarkosinu (zelená křivka). Z obrázku je jasně patrné, že pík s migračním časem 39 minut není signálem sarkosinu, protože se po přidávku standardního roztoku sarkosinu jeho plocha nezvětšila. Naopak se objevil pík s migračním časem 36 minut odpovídající sarkosinu. V buněčných lyzátech tedy nebyl sarkosin detekován. Tento stav může být způsoben nízkým obsahem sarkosinu v buňkách (pod limitem detekce) nebo ředěním předcházejícím analýzu. Toto ředění však bylo pro optimalizaci iontové síly nezbytné.



Obrázek č. 17 – Chromatogram buněčného lyzátu ředěného v ředícím pufru (červená linka) a chromatogram lyzátu s přídávkem standardu sarkosinu (zelená linka)

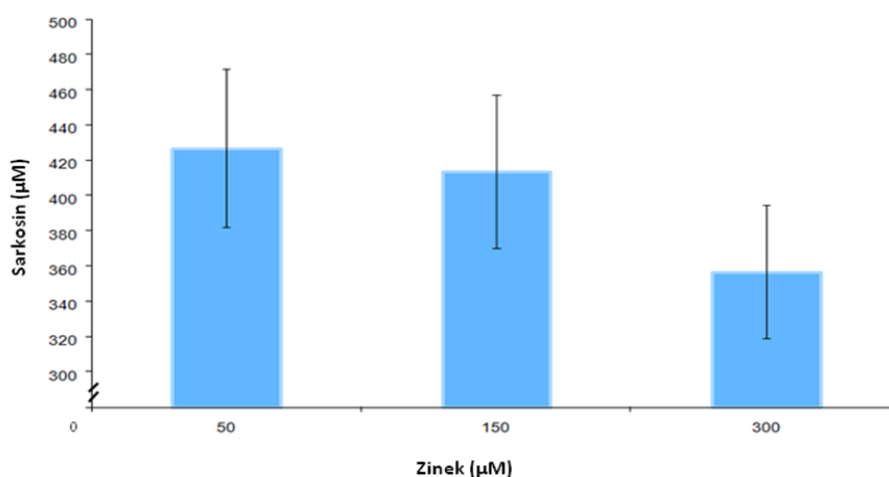
4.2.4. CE

Před analýzou pomocí CE byly lyzované buňky naředěny s Milli-Q vodou v poměru 1:1. Obr. č. 18 ukazuje typický elektroferogram buněčného lyzátu, ze kterého je patrná relativně složitá matrice reálného vzorku. Metodou standardního přidavku byl identifikován sarkosin, jehož výsledný obsah byl vypočten z kalibrační křivky.



Obrázek č. 18 – Elektroferogram buněčného lyzátu

Na obr. č. 19 lze jasně vidět vliv množství přidaného zinku na množství sarkosinu. Se zvyšující se hodnotou přidavku zinku docházelo ke snižování počtu nádorových prostatických buněk, což mělo za následek snižování hladiny sarkosinu.



Obrázek č. 19 – Závislost množství sarkosinu na obsahu zinku přidaného do živného média nádorových prostatických buněk linie 22Rv1

4.3. Analýza vzorků moči

Pro analýzu sarkosinu z moči bylo použito celkem 37 vzorků. Kontrolní skupinu tvořilo 26 vzorků, jenž byly odebrány mužům bez nádorových onemocnění prostaty. Z toho 3 vzorky patřily mužům, u nichž byl karcinom prostaty v minulosti potvrzen, ale po podstoupení léčby se v jejich těle, podle v současnosti používaných testů, již nevyskytuje. Od pacientů s lékařsky potvrzenou přítomností karcinomu prostaty bylo použito celkem 11 vzorků.

4.3.1. Biochemické parametry vzorků moči

Současně se sarkosinem byly v moči analyzovány i jiné biochemické parametry, a to konkrétně ionty (Na^+ , K^+ , Cl^-), proteiny, glukóza, kyselina močová, kreatinin, močovina a pH. Tyto parametry byly detekovány pomocí automatického spektrofotometru BS – 400 s použitím 20 μl vzorku moči a 200 μl příslušné reagentie. Každý parametr byl analyzován celkem třikrát. Individuální průměrné hodnoty těchto parametrů i s odchylkami měření jsou, jak pro soubor pacientů, tak pro kontrolní skupiny, uvedeny v tabulkách č. 4, 5 a 6.

| Hodnoty biochemických parametrů mužů s karcinomem prostaty | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|------------------------|-------------------|------------------|---------|
| věk | sarkosin (μM) | Na^+ (mM) | K^+ (mM) | Cl^- (mM) | proteiny (mg/l) | glukóza (mM) | kys. močová (mM) | kreatinin (mM) | močovina (mM) | pH |
| 62 | 1480 | 237±2 | 76±1 | 124±2 | 62±5 | 0.40±0.03 | 6.94±0.08 | 17.7±0.3 | 399±5 | 7.6±0.1 |
| 64 | 770 | 204±2 | 77±1 | 132±1 | ND ¹⁹ | 0.20±0.02 | 3.41±0.05 | 12.9±0.2 | 387±9 | 6.7±0.1 |
| 65 | 830 | 202±1 | 96±1 | 146±1 | ND | 0.19±0.02 | 1.93±0.03 | 14.2±0.4 | 355±7 | 5.5±0.1 |
| 67 | 640 | 182±2 | 33±1 | 85±2 | ND | 0.15±0.01 | 3.35±0.07 | 12.0±0.2 | 364±6 | 6.2±0.1 |
| 70 | 337 | 106±2 | 119±2 | 130±1 | 12±2 | 0.38±0.02 | 2.51±0.08 | 10.3±0.1 | 370±6 | 7.4±0.1 |
| 71 | 321 | 96±1 | 103±1 | 131±1 | 42±3 | 0.22±0.01 | 1.95±0.07 | 7.4±0.1 | 283±7 | 5.5±0.1 |
| 72 | 121 | 88±2 | 68±1 | 73±1 | 12±3 | 0.49±0.02 | 2.08±0.06 | 11.9±0.2 | 401±9 | 5.5±0.1 |
| 73 | 530 | 92±2 | 67±1 | 74±1 | 13±2 | 0.32±0.02 | 2.21±0.03 | 7.4±0.3 | 218±6 | 6.5±0.1 |
| 74 | 186 | 120±1 | 89±1 | 91±1 | 17±4 | 3.93±0.09 | 0.99±0.03 | 7.5±0.3 | 366±7 | 5.4±0.1 |
| 75 | 15 | 115±2 | 85±1 | 116±2 | 18±3 | 0.18±0.01 | 1.93±0.04 | 10.2±0.4 | 402±9 | 5.4±0.1 |
| 76 | 190 | 176±2 | 47±1 | 81±1 | ND | 0.65±0.02 | 1.75±0.04 | 15.7±0.2 | 195±7 | 5.2±0.1 |

Tabulka č. 4 – Hodnoty biochemických parametrů pacientů s nádory prostat

¹⁹ ND = biochemický parametr nebyl ve vzorku detekován

| Hodnoty biochemických parametrů mužů bez karcinomu prostaty | | | | | | | | | | |
|--|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------|------------------------|-------------------|------------------|---------|
| věk | sarkosin (μ M) | Na ⁺ (mM) | K ⁺ (mM) | Cl ⁻ (mM) | proteiny (mg/l) | glukóza (mM) | kys. močová (mM) | kreatinin (mM) | močovina (mM) | pH |
| 17 | ND | 98±1 | 57±1 | 79±1 | ND | 0.23±0.02 | 2.24±0.06 | 13.2±0.3 | 102±2 | 6.5±0.1 |
| 19 | ND | 112±2 | 99±1 | 119±1 | ND | 0.40±0.03 | 2.32±0.03 | 10.3±0.3 | 342±4 | 6.3±0.1 |
| 19 | ND | 114±1 | 98±1 | 128±1 | ND | 0.20±0.02 | 3.35±0.06 | 15.2±0.2 | 333±7 | 6.3±0.1 |
| 19 | ND | 131±2 | 97±2 | 136±2 | 43±5 | 0.66±0.03 | 2.4±0.04 | 9.0±0.1 | 200±4 | 7.0±0.1 |
| 19 | ND | 99±1 | 73±1 | 86±1 | ND | 0.43±0.02 | 2.47±0.05 | 10.0±0.2 | 274±5 | 6.3±0.1 |
| 21 | ND | 100±1 | 101±1 | 113±1 | ND | 0.49±0.01 | 2.59±0.08 | 9.8±0.2 | 230±4 | 6.7±0.1 |
| 21 | ND | 117±1 | 111±1 | 129±1 | ND | 0.30±0.01 | 3.11±0.09 | 8.1±0.2 | 361±6 | 6.2±0.1 |
| 21 | ND | 111±2 | 136±1 | 104±2 | ND | 0.16±0.01 | 2.65±0.06 | 10.3±0.1 | 84±3 | 6.6±0.1 |
| 21 | ND | 144±1 | 94±1 | 115±2 | ND | 0.24±0.01 | 1.7±0.03 | 7.6±0.2 | 350±7 | 7.0±0.1 |
| 22 | ND | 149±1 | 116±1 | 108±1 | ND | 0.17±0.01 | 2.84±0.02 | 8.3±0.1 | 92±3 | 6.5±0.1 |
| 22 | ND | 105±1 | 102±2 | 122±1 | ND | 0.11±0.01 | 2.75±0.06 | 8.1±0.2 | 154±3 | 6.4±0.1 |
| 22 | ND | 117±1 | 77±1 | 113±1 | 64±4 | 0.33±0.02 | 3.35±0.05 | 8.3±0.2 | 276±6 | 6.3±0.1 |
| 22 | ND | 88±1 | 36±1 | 90±1 | ND | 0.10±0.01 | 1.95±0.03 | 8.0±0.2 | 336±6 | 6.4±0.1 |
| 22 | ND | 108±1 | 65±1 | 110±1 | 47±4 | 0.21±0.01 | 4.45±0.08 | 14.0±0.3 | 338±3 | 6.1±0.1 |
| 23 | ND | 99±2 | 89±2 | 78±2 | ND | 0.26±0.01 | 3.31±0.04 | 11.0±0.2 | 359±1 | 7.0±0.1 |
| 24 | ND | 159±2 | 100±1 | 121±2 | ND | 0.21±0.02 | 2.44±0.04 | 12.7±0.2 | 324±2 | 6.4±0.1 |
| 24 | ND | 132±1 | 98±1 | 135±2 | ND | 0.20±0.02 | 3.57±0.04 | 9.8±0.1 | 328±3 | 6.4±0.1 |
| 25 | ND | 87±2 | 66±1 | 104±2 | ND | 0.28±0.02 | 3.54±0.06 | 14.5±0.2 | 338±4 | 6.7±0.1 |
| 26 | ND | 95±1 | 55±2 | 83±1 | ND | 0.14±0.01 | 2.76±0.04 | 12.6±0.3 | 167±6 | 6.4±0.1 |
| 28 | ND | 129±2 | 67±1 | 94±1 | ND | 0.18±0.02 | 2.91±0.04 | 8.8±0.4 | 205±7 | 6.0±0.1 |
| 29 | ND | 98±1 | 108±2 | 111±1 | 63±4 | 0.29±0.02 | 3.36±0.06 | 8.3±0.1 | 246±5 | 7.2±0.1 |
| 31 | ND | 113±2 | 36±1 | 83±1 | ND | 0.54±0.03 | 2.26±0.03 | 14.5±0.4 | 236±6 | 6.2±0.1 |

Tabulka č. 5 – Hodnoty biochemických parametrů zdravých mužů

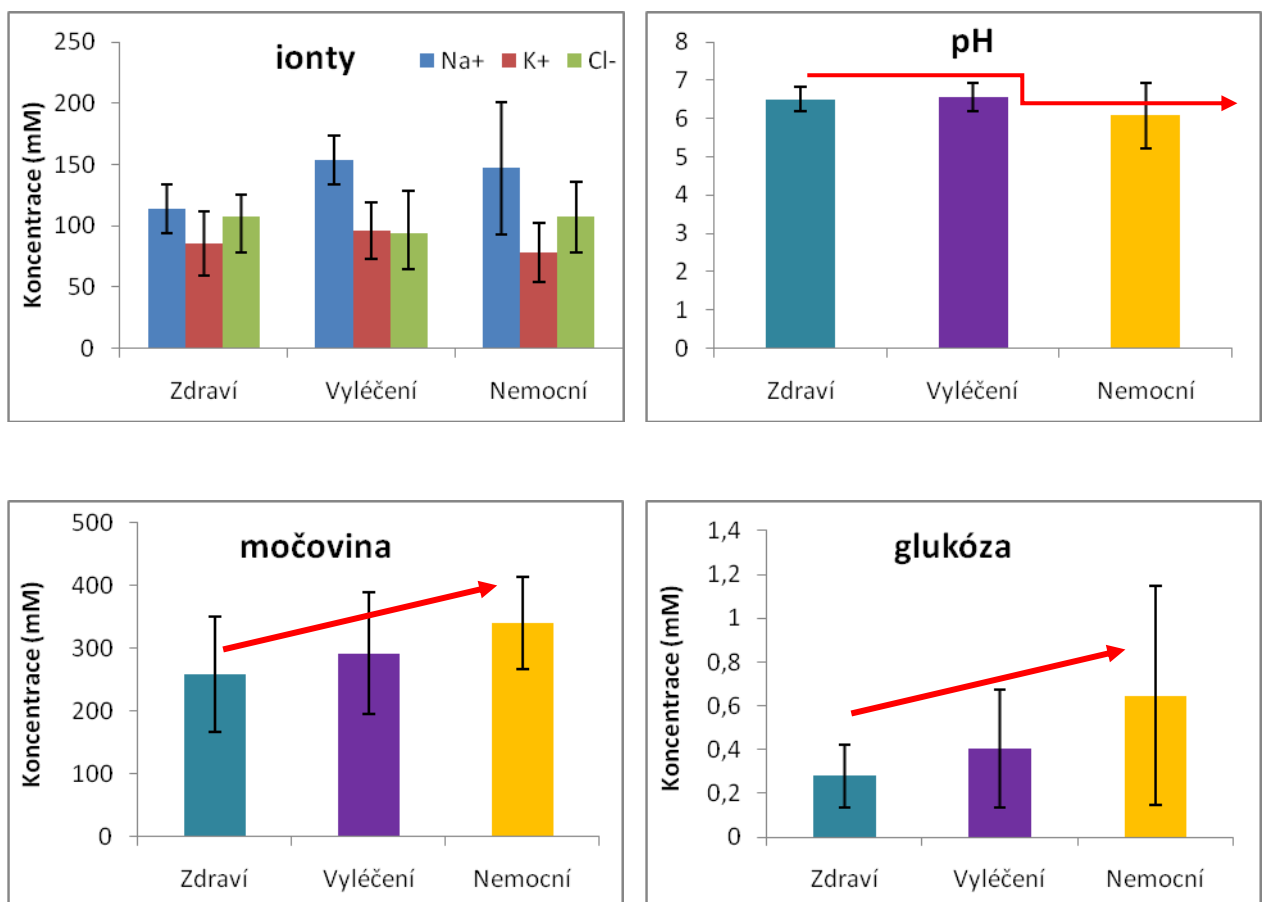
| Hodnoty biochemických parametrů „vyléčených“ mužů s karcinomem prostaty | | | | | | | | | | |
|--|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------|------------------------|-------------------|------------------|---------|
| věk | sarkosin (μ M) | Na ⁺ (mM) | K ⁺ (mM) | Cl ⁻ (mM) | proteiny (mg/l) | glukóza (mM) | kys. močová (mM) | kreatinin (mM) | močovina (mM) | pH |
| 65 | ND | 175±2 | 120±1 | 135±1 | ND | 0.12±0.01 | 3.43±0.05 | 6.8±0.2 | 387±7 | 6.3±0.1 |
| 69 | ND | 136±1 | 94±1 | 72±1 | 53±4 | 0.66±0.02 | 2.32±0.07 | 6.3±0.2 | 194±9 | 7.0±0.1 |
| 70 | ND | 150±1 | 74±1 | 76±1 | ND | 0.43±0.02 | 2.19±0.09 | 9.9±0.2 | 294±9 | 6.4±0.1 |

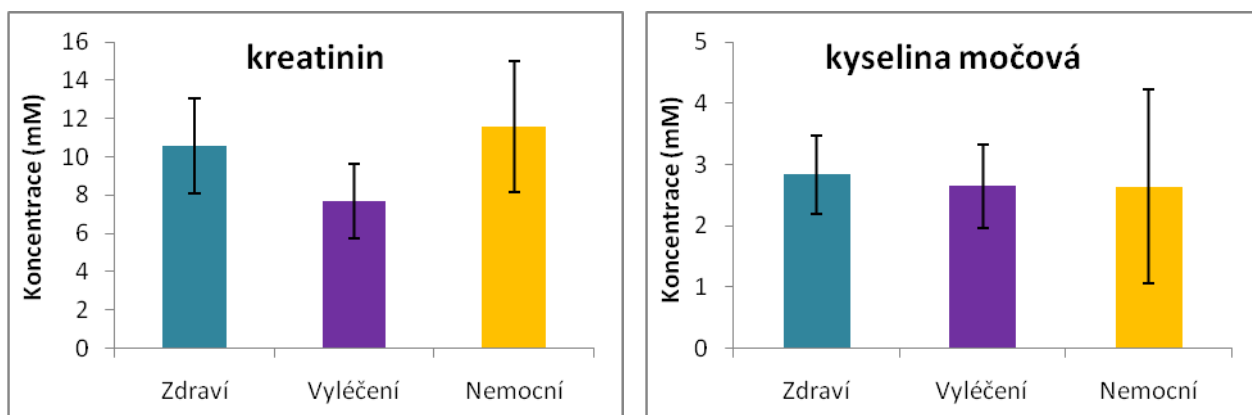
Tabulka č. 6 – Hodnoty biochemických parametrů „vyléčených“ pacientů

Celkové průměrné hodnoty biochemických parametrů byly následně porovnány mezi kontrolními skupinami a pacienty s nádory prostaty (obr. č. 20). Byla snaha nalézt závislost hodnot těchto parametrů na přítomnost nádorů prostaty.

Jediná viditelná změna nastala v případě hladiny pH, což je pravděpodobně způsobeno podáváním léků pacientům s nádory prostaty. Dále byl zaznamenán narůstající trend hodnot v případě množství glukózy a močoviny, který je zřejmě způsoben nárůstem věku a zvýšenou pravděpodobností výskytu dalších nemocí, např. diabetes II. typu. Žádný s těchto trendů však není statisticky prokazatelný.

Z výsledků měření tedy vyplývá, že žádný parametr nemůže být považován za možný biomarker nádorů prostaty.



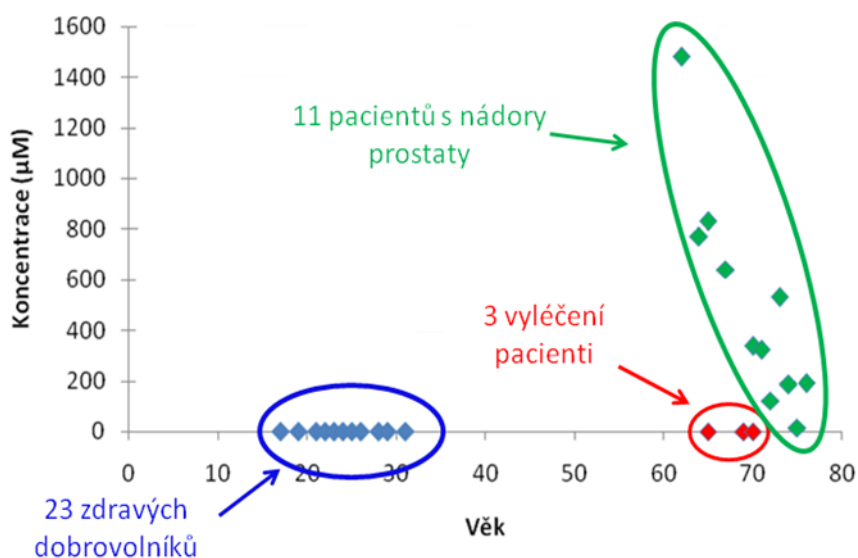


Obrázek č. 20 – Srovnání biochemických parametrů mezi souborem mužů bez nádorů prostaty (zdraví), vyléčenými (vyléčení) i současnými (nemocní) pacienty s nádory prostaty

4.3.2. HPLC

Před analýzou sarkosinu pomocí Analyzátoru aminokyselin AAA 400 musel být každý vzorek 10x naředěn vředícím pufru, následně byla takto vzniklá směs promíchána na Vortexu.

Na obr. č. 21 lze vidět závislost množství sarkosinu na stáří mužů. Modrou barvou jsou znázorněny vzorky moči odebrané od mužů bez karcinomu prostaty, zelenou barvu představují vzorky od pacientů a tři červené body představují již zmíněné muže, kteří touto nemocí v minulosti trpěli.

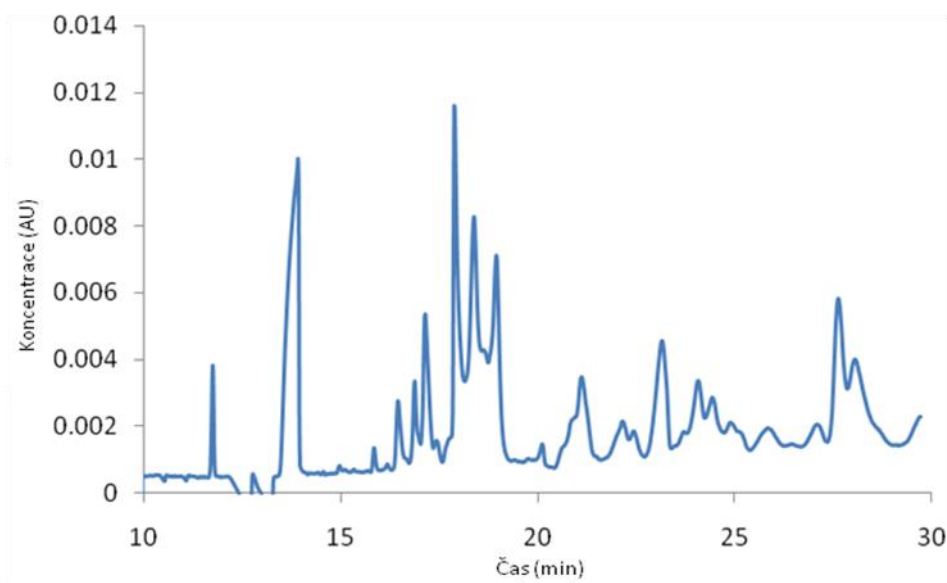


Obrázek č. 21 – Závislost množství sarkosinu na věku mužů

Z uvedených dat lze soudit, že hladina sarkosinu u mužů s pozitivní diagnózou nádorů prostaty je signifikantně zvýšená ve srovnání s hladinou u kontrolních vzorků. Navíc si lze všimnout, že pacienti, jež prodělali léčbu, nevykazují zvýšené množství sarkosinu.

4.3.3. CE

Moč je složitá biologická matrice, díky tomu byla její analýza pomocí CE značně ztížena. Na rozdíl od selektivity, kterou poskytuje HPLC, je CE metoda relativně univerzální, a proto poskytuje signály výrazně vyššího počtu látek, což ztěžuje jejich identifikaci. Jak je vidět na obr. č. 22, během separace nedošlo ke kompletnímu rozdělení této složité směsi a ani metodou standardního přidavku nebyl signál sarkosinu spolehlivě identifikován. Z toho důvodu vyžaduje analýza moči důkladnou předpřípravu vzorku spojenou s deproteinací²⁰.



Obrázek č. 22 – Elektroferogram vzorku moči pacienta s karcinomem prostaty

²⁰ odstraněním bílkovinných složek

Byly testovány dva postupy úpravy vzorku nalezené v literatuře. V prvním případě byly do 2 ml moči přidány 2 ml metanolu a takto naředěná moč byla 10 min centrifugována. Poté byla tekutina od vzniklé sraženiny odpipetována, přidána do 4 ml vody a zanalyzována.

Podle druhého postupu byl ke 2 ml moči přidán 1 ml 10% trifluoroctové kyseliny (TFA), vniklá směs byla také 10 min centrifugována a následně oddělena od sraženiny vysokomolekulárních složek a smíchána s 3 ml vody. Takto připravené vzorky byly podrobeny analýze CE.

Bohužel, žádná z těchto metod nepřinesla výrazné zjednodušení směsi, které by vedlo ke zlepšení analýzy. V budoucnu bude metoda přípravy vzorku stejně jako metoda separace dále optimalizována, aby byl minimalizován matriční efekt, a aby bylo zlepšeno rozlišení.

5. Závěr

Sarkosin je jedním z potenciálních markerů nádorových onemocnění prostaty. V současnosti však existuje mnoho diametrálně odlišných vědeckých názorů, zda ho lze a nebo nelze takto využít. V této práci byla studována možnost stanovení sarkosinu v moči pomocí dvou separačních metod - vysokoúčinné kapalinové chromatografie s ionexovou separací a kapilární elektroforézy.

Bylo zjištěno, že pro detekci sarkosinu, v tak složité matrici jako je moč, se jako vhodnější jeví chromatografie. Výsledky získané pomocí této metody korelují s názorem, že hladina sarkosinu je u pacientů s karcinomem prostaty výrazně zvýšena. Současně byly v moči stanoveny a porovnány další biochemické parametry. Žádný z analyzovaných parametrů nevykazoval prokazatelně rozdílnou hladinu v případě výskytu nádorů prostaty.

Dále bylo zjištěno, že s přibývajícím koncentrací zinku přidaného do živného média nádorových prostatických buněk roste jejich úmrtnost a v důsledku toho klesá hladina sarkosinu v jejich lyzátech.

Výsledky experimentální práce vykazují slibný trend využití sarkosinu pro diagnostiku nádorových onemocnění prostaty, ale je potřeba ještě mnoho dalších studií, než bude možno, jestli vůbec bude, využívat sarkosin v běžné klinické diagnostice nádorů prostaty.

6. Seznam citací

1. DIENSTBIER, Zdeněk; *Rakovina prostaty*, Praha: Liga proti rakovině, 2009, s. 7-8
2. ADAM, Zdeněk; VORLÍČEK, Jiří a kol.; *Speciální onkologie*, Brno: Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta, 2002, Karcinom prostaty, s. 150-156, ISBN: 80-210-2826-2
3. LUKEŠ, Martin; ZÁLESKÝ, Miroslav a kol.; *Molekulární genetika karcinomu prostaty*, Galém, 2002, s. 9-11, ISBN: 8072621858
4. ČTK, *Partner pro zdraví* [online], 3.2.2010 [cit. 2011-02-13], ČR by měla zavést plošný screening na rakovinu prostaty, dostupné z WWW: <<http://www.ppzdravi.cz/preventivni-prohlidky-1/cr-by-mela-zavest-plosny-screening-na-rakovinu-prostaty.html>>
5. JAROLÍM, Ladislav; *Solen* [online], 2008 [cit. 2011-02-14], Problematika kostních metastáz u karcinomu prostaty, dostupné z WWW: <<http://www.solen.cz/pdfs/uro/2008/03/02.pdf>>
6. MARKS, Sheldon; *Rakovina prostaty: rodinný průvodce diagnózou, léčbou a možnostmi přežití*, Praha: Pragma, 1999
7. HRABEC, Martin; doc. MUDr. ŠTUDENT, Vladimír; MUDr. GREPL, Michal; *Urologie pro praxi* [online], 2008 [cit. 2011-02-14], PSA-Velocita a její význam pro včasnou diagnostiku CA prostaty, dostupné z WWW: <<http://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2008/06/06.pdf>>
8. ABRAHÁMOVÁ, Jitka; *Vybrané otázky onkologie XIII.*, Galen, 2009
9. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression, *Nature*, 12. 2. 2009, 07598, s. 910-915
10. *Aminokyseliny* [online], Praha, 2005, semestrální práce, Karlova univerzita, dostupné z WWW: <biochemie.euweb.cz/Biochemie/Aminokyseliny.ppt >
11. FRANKLIN, R.B.; COSTELLO L.C.; *Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 463 (2), p. 211-217
12. GUMULEC, J. et al.; *MENDELnet articles* [online], 2010 [cit. 2011-02-15], Metallothionein – zinc – prostate – cancer: pathogenesis and diagnostic use, dostupné z WWW: <http://web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet2010/articles/22_gumulec_413.pdf>

7. Seznam použitých zdrojů

1. *Moje prostata* [online], 2009 [cit. 2011-02-16], dostupné z WWW: <<http://www.mojeprostata.cz/prostata/o-prostate>>
2. *Prostata* [online], [cit. 2011-02-24], Prostata, dostupné z WWW: <<http://prostata.ordinace.biz/>>
3. SRIPRASAD, S.; FENELEY M.R.; THOPSON P.M.; *History of prostate cancer treatment*, Surgical Oncology-Oxford, 2009, 18 (3), p. 185-191
4. KOLOMBO, Ivan; *ARCUS onko centrum* [online], 2009 [cit. 2011-02-19], Rakovina prostaty, dostupné z WWW: <http://www.arcus-oc.org/download/brozura_prostata.pdf>
5. SCHRAML, Jan; *Postgraduální medicína* [online], 11. 10. 2008 [cit. 2011-02-13], Specifický antigen (PSA), dostupné z WWW: <<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/specificky-antigen-psa-405991>>
6. THANIGASALAM, R. et al.; *Prostate-specific antigen velocity (PSAV): a practical role for PSA?*, Anz Journal of Surgery, 2009, 79 (10), s. 703-706
7. *Wikipedia* [online], 7. 2. 2011 [cit. 2011-02-16], Sarcosine, dostupné z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Sarcosine>>
8. *Automatický analyzátor AAA 400: Příručka uživatele*, Ingos, 2007, 100 s
9. CHUDÁČEK, J.; JANDERA, P.; *Separace látek: Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*, Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1986
10. PLAČEK, Lukáš; *Lukáš Plašek* [online], [cit. 2011-02-14], Kapilární elektroforéza, dostupné z WWW: <http://placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CE.pdf>
11. *VŠCHT* [online], [cit. 2011-02-19], Elektroforéza, dostupné z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf>
12. *Southern Matters* [online], [cit. 2011-02-24], Spectrophotometry, dostupné z WWW: <http://www.southernmatters.com/BSC_3402L/J--Use_of_Spectrophotometer.pdf>
13. ADAM, Zdeněk; VORLÍČEK, Jiří a kol.; *Obecná onkologie*, Brno: Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta, 2004, ISBN 80-210-3574-9

14. CHANG, Chawnshang; *Prostate cancer: basic mechanismus and therapeutic approaches*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2005
15. ŠLAMPA, Pavel; ŠIMÍČEK, Jiří a kol.; *Radiační onkologie*, Galén a Karolinum, 2007, s. 287-288
16. KOUTECKÝ, Josef a kol.; *Klinická onkologie*, Praha: Avicenum, 1989, s. 240-245
17. KLIMEŠ, Lumír a kol.; *Slovník cizích slov*, Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1985, 791 s.