

(celkový PSA, hK3 – serínová proteáza) (1), ktorý sa síce označuje ako onkomarker, je však veľmi nespoľahlivý – málo nádorovo-špecifický a zvýšený aj pri benígnych patológiách či početných rutinných aktivitách (2). Aby sa mohol znížiť počet negatívnych biopsií (štatisticky až 3 zo 4, pričom falošná negativita sa pohybuje okolo 20%) (3, 4), je potrebný spoľahlivejší marker. Ideálnym nástrojom ako „test druhej voľby“ sa ukazujú práve metódy tzv. tekutej biopsie, teda detekcie vysoko nádorovo-špecifických markerov z telových tekutín. V súčasnosti ide prevažne o metódy detekcie cirkulujúcich nádorových buniek (CTC, circulating tumour cells), extracelulárnych vezikúl (exozómov), cfDNA (cell free DNA – voľná cirkulujúca DNA) či miRNA (mikro RNA). Ide o postupy často náročné na úpravu vzorky, v čom sa odráža aj nákladovosť ponúkaných testov na svetovom trhu (5). V tomto texte autori opisujú svoje skúsenosti s diagnostikou karcinómu prostaty (CaP) s využitím jednoduchého a inovatívneho testu založeného na detekcii zmien glykánových štruktúr (glykány sú komplexné sacharidy viazané na proteíny alebo lipidy) na tkanivovo-špecifickom markeri – fPSA, ako jedného z moderných prístupov tzv. tekutej biopsie.

Incidencia CaP sa pritom bude ďalej zvyšovať – od 1,41 milióna prípadov celosvetovo v roku 2020 až po 2,43 milióna v roku 2040. Rovnaký trend sa predpokladá v súvislosti s mortalitou, pri ktorej sa v rovnakom období očakáva nárast z 375 tisíc na 740 tisíc úmrtí (6). Celkové sérové PSA, často nesprávne využívané na skrining CaP, má až 70% falošnú pozitivitu – na tento fakt často upozorňoval aj objaviteľ PSA patológ Richard Ablin (7). Test vznikol ako súčasť implementácie viacerých európskych projektov na Slovenskej akadémii vied. Dá sa univerzálne využiť aj na detekciu a monitoring iných typov nádorových ochorení za predpokladu, že sú známe tkanivovo-špecifické markery prítomné v sére či iných telových tekutinách, ktoré sú zároveň glykozylované.

Genomika, proteomika a glykomika

Genomika a proteomika ako odbory, ktoré sa zaoberajú štúdiom súboru všetkých génov a proteínov v danom organizme, his-

toricky napredovali rýchlejšie ako glykomika z dôvodu dostupnosti PCR metódy a sekvenčných technológií. Glykány, komplexné a vetvené sacharidy konjugované s proteínmi (*N*- a *O*-glykoproteíny či proteoglykány) a lipidmi (glykosfingolipidy), majú v porovnaní s nukleovými kyselinami a peptidmi vyšší kombinatorický potenciál, a teda môžu dobre slúžiť na kódovanie biologickej informácie. Zároveň sú zodpovedné za mnohé bunkové deje vrátane adhézie či medzibunkovej signalizácie, zodpovedajú za stabilitu, rozpustnosť a skladanie do natívnej štruktúry niektorých proteínov (rôzne enzýmy) či ich biologickej funkcie (IgG – imunoglobulín G), ako aj za určenie krvných skupín (systém ABO) (8). Zmeny glykánových štruktúr sú typickým znakom nádorovej bunky v dôsledku zmeny expície glykán modifikačných enzýmov a fragmentácie Golgiho aparátu (9). Aj preto sa zvyknú glykány označovať ako tretia abeceda molekulárnej biológie. Na analýzu glykánov sa rutinne využívajú metódy, ktoré pre svoju časovú a finančnú náročnosť, ako aj náročnosť na expertízu operátora, nie sú kompatibilné s klinickou praxou. Patrí sem najmä hmotnostná spektrometria s tzv. mäkkými ionizačnými metódami v kombinácii s kvapalinovou chromatografiou a kapilárnou elektroforézou. Autori nižšie prezentujú výsledky využitia slovenskej technológie založenej na analýze glykánov viazaných na molekulu fPSA v štandardnom ELISA (enzyme linked immunosorbent assay – enzýmová imunosorpčná

analýza) formáte s kolorimetrickým detekčným princípom (patent PCT/EP2019/057386) (10, 11).

Glykoprolácia pri diagnostike karcinómu prostaty

Zatiaľ čo je súčasná laboratórna diagnostika prostaty centralizovaná okolo imunoanalytického stanovenia (kvantitatívnej analýzy) kalikreínov, ako tPSA (cPSA + fPSA), f/tPSA (%), PHI index (kombinácia tPSA, fPSA a p2PSA) či 4k Score® (kombinácia tPSA, fPSA, iPSA a hK2), glykoprolácia kombinuje tkanivovú špecifitu vyššie uvedených markerov s nádorovou špecifitou zmien glykánov. Test je (oproti zlatému štandardu v analýze glykánov – hmotnostnej spektrometrii a kvapalinovej chromatografii) založený na jednoduchom ELISA formáte, rutinne využívanom prakticky v každom klinickom laboratóriu. Ľahká dostupnosť robí z tohto formátu rýchly, robustný a reprodukovateľný test dosahujúci vysokú presnosť najmä v sivej zóne (tPSA = 2 až 10 ng/ml), využívajúc krvné sérum. Princíp testu je znázornený na obrázku 1. Glykozylácia je najbežnejšia posttranslačná modifikácia proteínov v eukaryotických bunkách, pričom určité zmeny v štruktúre glykánov sú typické pre nádorové bunky (Lewisove antigény, hypersialylácia, fukozylácia či výskyt komplexnejších štruktúr s vysokým stupňom vetvenia) (12). Porovnanie testu s ostatnými možnosťami na komerčnom trhu, konkrétne tPSA a testami druhej voľby – fPSA (%) a PHI, sa realizovalo

Obr. 1. Princíp glykoprolácie fPSA (vľavo, kód 3QUM) ako tkanivovo-špecifického markera CaP pomocou lektínov rozpoznávajúcich glykán (vpravo, kód *Wisteria floribunda* aglutinínu (WFA) 5KXB – proteín schopný rozoznávať glykány). fPSA nesie štandardne komplexný typ *N*-glykán na Asn-69 (Asn – aminokyselina asparagín), pričom môže byť aj *O*-glykozylovaný – podobne ako napríklad mucín 1. Zdroj štruktúr: RCSB Protein Data Bank

