

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULETA ZA FARMACIJO

MITJA BIZJAK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULETA ZA FARMACIJO

MITJA BIZJAK

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA PREKURZORJA
PROSTATNO SPECIFIČNEGA ANTIGENA PRI BOLNIKI
Z NIZKO CELOKUPNO PLAZEMSKO KONCENTRACIJO
PROSTATNO SPECIFIČNEGA ANTIGENA**

**CLINICAL VALUE OF PRECURSOR PROSTATE SPECIFIC
ANTIGEN IN PATIENTS WITH LOW PLASMA
CONCENTRATION OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljal na Univerzitetnem Kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Analize so bile opravljene v UKC Ljubljana.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za vsa koristna navodila in strokovne nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Najlepše se zahvaljujem kolektivu Adria lab d.o.o. in predvsem svoji družini Lidiji, Tjaši in Maruši za spodbudne besede ter podporo v času študija. HVALA.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, junij 2016

Mitja Bizjak

Predsednik komisije za zagovor: izr. prof. Janez Ilaš, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, spec. med. biokem., višji svetnik

Član komisije za zagovor: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

VSEBINA

1. UVOD.....	1
1.1. ANATOMIJA PROSTATE	2
1.2. BOLEZENSKA STANJA PROSTATE.....	3
1.3. BOLEZENSKI ZNAKI RAKA PROSTATE	4
1.3.1. <i>Najpogostejši simptomi</i>	4
1.4. PRESEJANJE IN DIAGNOSTIKA RAKA PROSTATE	5
1.4.1. <i>Presejanje</i>	5
1.4.2. <i>Diagnostika raka prostate</i>	5
1.4.3. <i>Preiskave za ugotavljanje razširjenosti in stadija raka prostate</i>	7
1.5. ZDRAVLJENJE KARCINOMA PROSTATE.....	7
1.6. TUMORSKI OZNAČEVALCI.....	8
1.7. PROSTATNO SPECIFIČNI ANTIGEN (PSA)	9
1.7.1. <i>Določanja PSA</i>	10
1.7.2. <i>Biokemijske lastnosti PSA</i>	10
1.7.4. <i>Pomen povišane koncentracije tPSA</i>	12
1.8. PROSTI PSA IN RAZMERJE fPSA/tPSA.....	13
1.9. [-2]proPSA (p2PSA)	15
1.10. PHI »Prostate Health index«	16
2. NAMEN DELA	17
2.1. HIPOTEZE.....	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. MATERIALI.....	18
3.2. PRINCIP METODE.....	19
3.2.1. <i>Značilnosti metod</i>	19
3.2.2. <i>Postopek testiranja</i>	20
3.2.3. <i>Stabilnost p2PSA, fPSA in tPSA</i>	21
3.3. ZBIRANJE PREISKOVANCEV IN VZORCEV	21
4. REZULTATI	22
4.1. POTEK OBDELAVE PODATKOV IN STATISTIČNE METODE	22
4.2. OPISNA STATISTIKA	23
4.3. TESTIRANJE NORMALNE PORAZDELITVE	24
4.3. TESTI ZA PRIMERJAVO POVPREČJA DVEH NEODVISNIH VZORCEV	30
4.4. DOLOČANJE REFERENČNIH INTERVALOV	31
4.5. DIAGNOSTIČNE VREDNOSTI TESTOV	32

4.6. ROC KRIVULJE - PRIMERJAVA DIAGNOSTIČNIH TESTOV	34
4.7. INTERVALI PHI	41
4.8. IZRAČUN OPTIMALNE REFERENČNE VREDNOSTI (CUT-OFF)	42
4.9. KORELACIJA ALI MOČ POVEZAVE MED SPREMENLJIVKAMI	43
5. RAZPRAVA.....	44
6. SKLEP	48
7. LITERATURA	49
8. PRILOGA	53

KAZALO SLIK, PREGLEDNIC IN GRAFOV

Slika 1: Anatomija in cone prostate	2
Slika 2: Najpogostejša mesta raka po spolu v Sloveniji 2011	4
Slika 3: Molekulske oblike PSA.....	11
Slika 4: Prikaz kvartilnega diagrama	24
Preglednica I: Verjetnost PCa pri nizki koncentraciji tPSA in normalnik DRP	14
Preglednica II: Verjetnost PCa glede na konc. tPSA, %fPSA in normalnim DRP	14
Preglednica III: Opisna statistika vseh podatkov	23
Preglednica IV: Opisna statistika posameznih parametrov pri skupini preiskovancev z ne-malignimi obolenji prostate in skupini s potrjenim PCa.	23
Preglednica V: Rezultati testiranja normalnosti porazdelitve podatkov.	29
Preglednica VI: Rezultati Wilcoxonove vsote rangov W.....	Napaka! Zaznamek ni definiran.
Preglednica VII: Reultati Mann-Whitneyvega testa za parametre tPSA, %p2PSA, p2PSA, PHI in %fPSA.....	31
Preglednica VIII: Zgornje meje referenčnih intervalov za parametre %fPSA, p2PSA, %p2PSA in PHI.	31
Preglednica IX: Kontingenčna tabela za izračun diagnostične vrednosti p2PSA.	33
Preglednica X: Kontingenčna tabela za izračun diagnostične vrednosti %p2PSA.	33
Preglednica XI: Kontingenčna tabela za izračun diagnostične vrednosti PHI.	33
Preglednica XII: Rezultati izračunov diagnostičnih vrednosti parametrov %fPSA, p2PSA, %p2PSA in PHI pri zgornji meji referenčnega intervala.	34
Preglednica XIII: Podatki AUC za vse parametre.....	35
Preglednica XIV: Statistična primerjava AUC med %fPSA in %p2PSA, PHI ter p2PSA.	35
Preglednica XV: Specifičnost testov pri 95 , 90 , 85 in 80 občutljivosti.	38
Preglednica XVI: Občutljivost testov pri 95 , 90 , 85 in 80 specifičnosti.....	39
Preglednica XVII: Kontingenčna tabela prikazuje število preiskovancev razvrščenih glede na rezultate biopsije ob upoštevanju 90 % občutljivosti testov.....	40
Preglednica XVIII: Delež lažno pozitivnih biopsij upoštevajoč, kot edino merilo za biopsijo, vrednosti tumorskih markerjev	40

Preglednica XIX: Verjetnost za PCa pri različnih intervalih PHI in koncentraciji tPSA od 2,0 do 10,0 µg/L	41
Preglednica XX: Izračun verjetnosti relativnega tveganja za PCa pri različnih intervalih PHI iz naše študije.	41
Preglednica XXI: Razmerje obetov za PCa pri različnih intervalih PHI.	41
Preglednica XXII: Izračun maksimalnega Youden indeksa in optimalne referenčne vrednosti "cut-off" za posamezne parametre.	42
Preglednica XXIII: Rezultati koeficientov korelacije po Spearmanu.	43
Preglednica XXIV: Vrednosti parametrov 1. skupine, kjer biopsija ni potrdila PCa.	53
Preglednica XXV: Vrednosti parametrov 2. skupine, kjer biopsija je potrdila PCa.	55
Preglednica XXVI: Podatki kontrolne skupine za izračun referenčnih intervalov.	56
Graf 1: Prikaz vpliva mejne vrednosti na specifičnost in občutljivost analita.	9
Graf 2: Kvartilni diagram za parameter tPSA.	25
Graf 3: Kvartilni diagram za parameter p2PSA.	25
Graf 4: Kvartilni diagram za parameter PSAD.	26
Graf 5: Kvartilni diagram za parameter %fPSA.	26
Graf 6: Kvartilni diagram za parameter %p2PSA.	27
Graf 7: Kvartilni diagram za parameter PHI.	27
Graf 8: ROC krivulja za parameter tPSA.	36
Graf 9: ROC krivulja za parameter %fPSA.	36
Graf 10: ROC krivulja za parameter PHI.	37
Graf 11: ROC krivulja za parameter %p2PSA.	37
Graf 12: ROC krivulje za parametre tPSA, %fPSA, %p2PSA, PHI in p2PSA.	38
Graf 13: Prikaz specifičnosti pri različnih mejah občutljivosti.	39
Graf 14: Prikaz občutljivosti pri različnih mejah specifičnosti.	39

POVZETEK

Rak prostate je med vsemi rakavimi obolenji pri moških v svetu in Sloveniji na prvem mestu. Kljub množični uporabi PSA v klinični praksi še vedno ni priporočil za uporabo kot presejalni test za ugotavljanje raka prostate. Normalno je koncentracija celotnega PSA v serumu nizka, referenčna vrednost je $< 4,0 \mu\text{g/L}$ (Hybritech standard) oz. $< 3,1 \mu\text{g/L}$ (WHO standard). Povišana vrednost celotnega PSA predstavlja sum na rak prostate, a kljub temu zaradi slabe specifičnosti analita klinična diagnostika še vedno temelji na digitorektalnem pregledu in patohistološkem pregledu tkiva prostate. Namen magistrske naloge je bil oceniti klinični pomen določanja prekursorja PSA [-2]proPSA (p2PSA) in njegovih matematičnih izpeljank %p2PSA in PHI pri bolnikih z nizko plazemsko koncentracijo celotnega PSA. V statistično analizo smo vključili rezultate 103 vzorcev krvi moških, ki so imeli koncentracijo tPSA v tako imenovani sivi coni med 2,0 in 10,0 $\mu\text{g/L}$. Diagnoza raka prostate je bila potrjena z biopsijo in histološko analizo tkiva pri 31 bolnikih. V prvem delu smo rezultate razdelili v dve skupini glede na izvide biopsije in primerjali povprečne vrednosti testov med skupinama. Ugotovili smo, da so mediane parametrov p2PSA, %p2PSA in PHI statistično višje v skupini bolnikov s karcinomom prostate. Za parameter %fPSA smo dobili statistično nižjo mediano v skupini bolnikov z rakom prostate. Pri testu tPSA statistične razlike med skupinama ni bilo. Iz podatkov kontrolne skupine smo izračunali zgornje referenčne meje %fPSA (7,87 %), p2PSA (19,81 ng/L), %p2PSA (3,04 %) in PHI (63,8), s pomočjo katerih smo nato izračunali specifičnost in občutljivost tumorskih markerjev. V drugem delu smo izračunali površine pod ROC krivuljami AUC. Za klinično najbolj uporaben test se je izkazal %p2PSA (AUC = 0,759, $p < 0,0001$), PHI (AUC = 0,737, $p < 0,0001$) sledi p2PSA (AUC = 0,648, $p = 0,07$), %fPSA (AUC = 0,632, $p = 0,035$) in tPSA (AUC = 0,580, $p = 0,198$). AUC nam daje verjetnost, da bo metoda pravilno ločila pozitivne od negativnih, v našem primeru bolnike s rakom prostate od zdravih. Relativno tveganje za rak prostate pri skupini moških, ki so imeli PHI > 55 je bilo 3,9- krat višje kot pri skupini, ki je imela PHI $< 26,9$. V zadnjem delu smo ugotovili, da pri upoštevanju »cut-off« vrednosti %p2PSA pri 90 % občutljivosti, kot merilo za odločitev o izvedbi biopsije prostate, bi lahko znižali število nepotrebnih biopsij za 11 % v primerjavi z uporabo %fPSA.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da meritve p2PSA in njegovih derivatov %p2PSA ter PHI lahko izboljšajo detekcijo raka prostate pri preiskovancih, ki imajo koncentracijo tPSA od 2,0 do 10,0 $\mu\text{g/L}$, v primerjavi z uporabljenim testa %fPSA.

Ključne besede: tumorski označevalec, p2PSA, %p2PSA, PHI, rak prostate, PSA.

ABSTRACT

Of all malignant diseases occurring among men globally and in Slovenia, prostate cancer is the most common. In spite of mass use of PSA testing in clinical practice, recommendations for its application as a screening test for prostate cancer detection are still lacking. The total PSA serum levels are normally low the cut off is $< 4.0 \mu\text{g/L}$ (Hybritech standard) or $< 3.1 \mu\text{g/L}$ (WHO standard). Elevated total PSA levels represent suspected prostate cancer, but in spite of this, due to the low specificity of PSA test, clinical diagnostics is based on the digitorectal examination and the pathohistological examination of prostate gland tissue. The purpose of this master's thesis was to assess the clinical significance of determining the PSA precursor [-2]proPSA (p2PSA) and its mathematical derivatives %p2PSA and PHI, in patients with low total PSA plasma levels. The statistical analysis included the results for 103 blood samples from men having total PSA levels in so-called "diagnostic gray zone", between 2.0 and 10.0 $\mu\text{g/L}$. The diagnosis of prostate cancer was confirmed in 31 patients, by biopsy and histological tissue analysis. In the first part of the study, the results were divided to two groups based on biopsy results. We were found significant higher median values for p2PSA, %p2PSA and PHI in the group of patients with prostate cancer. The median value of %fPSA was significantly lower in group of patients with prostate cancer. Regarding the tPSA test, there was no significant difference between the two groups. From control group data, we calculated the upper reference limits for %fPSA (7.87%), p2PSA (19.81ng/L), %p2PSA (3.04 %) and PHI (63,8) and with their use the specificity and sensitivity of tumour markers were then obtained. In the second part of the study, the areas under the ROC curve AUC were calculated. The clinically most applicable test proved to be %p2PSA (AUC = 0.759, $p < 0.0001$) and PHI (AUC = 0.737, $p < 0.0001$) followed by p2PSA (AUC = 0.648, $p = 0.07$), %fPSA (AUC = 0.632, $p = 0.035$) and tPSA (AUC = 0.580, $p = 0.198$). AUC represents the ability of the test to discriminate malignant diseases from benign. The relative risk of prostate cancer in a group of men having PHI > 55 was 3.9 times higher than in a group of men having PHI < 26.9 . In the last part of the study, it was found that taking into account the %p2PSA cut-off value at 90% sensitivity for biopsy decision, the unnecessary biopsy could be reduced by 11% compared to the use of the %fPSA at the same level of sensitivity.

We conclude that p2PSA measurement and its derivatives %p2PSA and PHI improved prostate cancer detection better than %fPSA test in patients with a PSA of 2,0 to 10,0 µg/L.

Key words: tumour marker, p2PSA, %p2PSA, PHI, prostate carcinoma, PSA.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACT	alfa 1 antikemotripsin
API	alfa 1 proteazni inhibitor
A2M	alfa 2 makroglobulin
AUC	površina pod krivuljo (angl. area under the curve)
BHP	benigna hiperplazija prostate
BPSA	benigna oblika prostatno specifičnega antigena
cPSA	vezani PSA (angl. complexed PSA)
DRP	digitorektalni pregled prostate
EGTM	(angl. European Group of Tumor Markers)
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (angl. Food and Drug Administration)
fPSA	prosti prostatno specifični antigen
iPSA	neaktivni PSA (angl. intact PSA)
LH	luteinizirajoči hormon
LHRH	LH sproščujoči hormon (angl. LH releasing hormon)
NACB	(angl. National Academy of Clinical Biochemistry)
PCa	karcinom prostate
PHI	prostatični indeks (angl. Prostate Health Index)
PSA	prostatno specifični antigen
proPSA	prostatno specifični proantigen
PSAD	PSA gostota (angl. PSA density)
p2PSA	izomerna oblika proencima PSA [-2]proPSA
PSAV	PSA hitrost (angl. PSA velocity)
tPSA	celotni PSA (angl. total PSA)
TO	tumorski označevalec
TRUZ	transrektalni ultrazvok
%p2PSA	razmerje med koncentracijo p2PSA in fPSA
%fPSA	razmerje med koncentracijo prostega PSA in celotnega PSA

1. UVOD

Število obolelih za rakom prostate se naglo povečuje, kar vzbuja skrb in potrebo po izboljšanju rezultatov zdravljenja. Uspešna terapija je mogoča predvsem pri zgodnjem odkrivanju bolezni. Serumski marker prostatno specifični antigen (PSA) je najbolj razširjeni marker, ki se uporablja v praksi za zgodnje odkrivanje karcinoma prostate (PCa). Žal je PSA test pogosto povišan tudi pri drugih bolezenskih stanjih prostate, kot so prostatitis ali benigna hiperplazija prostate (BHP). Njegova specifičnost je slabša še posebej pri nižjih koncentracijah med 2 - 10 $\mu\text{g/L}$, kjer je z biopsijo diagnosticiranih 20 - 45 % PCa. Da bi izboljšali specifičnost so uvedli meritev prostega prostatno specifičnega antigena (fPSA) ter izračun razmerja med prostim PSA in celotnim PSA (%fPSA). Ugotovljene so bile različne molekulske oblike PSA, ki so značilno povezana z BHP ali rakom prostate. Te oblike PSA so encimsko neaktivne in jih delimo na prekuzorsko obliko fPSA (proPSA), benigni PSA (BPSA) in neaktivni PSA (iPSA), slednja dva sta bolj povezana z BHP. Prekuzorska oblika proPSA obstaja v več izomernih oblikah in so poimenovane glede na dolžino ostankov aminokislinskega zaporedja. Prva izomerna oblika je [-7]proPSA to obliko razcepi kalikrien 2 in tripsin, da dobimo aktivno molekulo PSA. Nepopolne oblike, ki vsebujejo ostanke aminokislinskega zaporedja 5, 4 ali 2 lahko detektiramo v serumu. Klinično so testirali vse izomerne oblike in kot najbolj obetavni marker za ugotavljanje raka prostate se je izkazal [-2]proPSA (p2PSA).

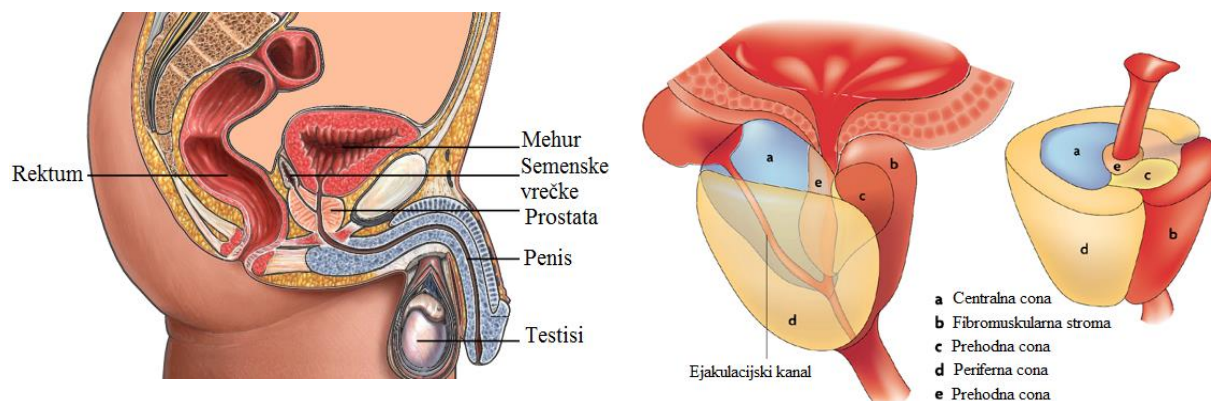
V retrospektivnih študijah so dokazali, da lahko pri moških s koncentracijo celotnega PSA (tPSA) med 2 in 10 $\mu\text{g/L}$, s testom p2PSA bolj specifično razlikujemo skupine z rakom prostate od BHP v primerjavi s testom %fPSA. V Beckman Coulter Incorporated so razvili matematično formulo, ki združuje tPSA, fPSA in p2PSA, t.i. prostatični indeks »Beckman Coulter Prostate health index« (PHI), ki je pokazala spodbudne rezultate v kliničnih raziskavah. V magistrski nalogi smo opravili študijo o možnostih uporabe p2PSA, izračuna %p2PSA in PHI, za boljšo diagnostiko raka prostate pri moških, ki so v postopku biopsije in digitalnega rektalnega pregleda prostate (DRP) v republiki Sloveniji in imajo vrednost tPSA v tako imenovani sivi coni med 2,0 do 10,0 $\mu\text{g/L}$.

1.1. ANATOMIJA PROSTATE

Prostata je kot kostanj velika žleza z zunanjim izločanjem, ki ima tudi mnogo gladkega mišičja. Leži tik pod sečnim mehurjem in iz vseh strani obdaja začetni del sečnice. Anatomijo in histologijo prostate je sodobnejše opisal McNeal, ki je razdelil prostato v tri osnovne žlezne cone in fibromuskularno stromo (1).

- **periferna cona** vsebuje 70% prostatičnega tkiva in zajema posteriorni, lateralni in apikalni del prostate.
- **centralna cona** vsebuje 25% žleznega tkiva, ki je piramidaste oblike z bazo na vratu mehurja in vrhom na veromontanumu.
- **prehodna cona** ima 5% žleznega tkiva in se nahaja okoli uretre. S starostjo pride v tej coni do hiperplazije in lahko zajema večino prostatičnega tkiva.
- **anteriorna fibromuskularna stroma**

Taka razdelitev prostate ima velik pomen pri anatomski opredelitvi najpogostejših patoloških dogajanj. Poznavanje razdelitve po McNealu je ključna za postavitev diagnoze pri pregledu z ultrazvokom ter transrektalni ultrazvočni biopsiji prostate (1).



Slika 1: Anatomija in cone prostate (2).

Približno 70 % raka na prostati se razvije v perifernem delu prostate. Nasprotno se v centralnem delu rak skoraj ne pojavlja (le 5 % primerov). 25% raka prostate, pa se razvije v prehodni coni, kjer v starosti pride do benigne hiperplazije prostate (3).

1.2. BOLEZENSKA STANJA PROSTATE

Atrofija

Atrofija pogosto prizadene periferni del prostate, osrednji in prehodni del sta občasno prizadeta (4).

Prostatitis

Vnetje prostate ali prostatitis ja lahko kronično ali akutno, bakterijsko ali ne-bakterijsko. Pri akutnem prostatitisu je značilen nepričakovan začetek bolezni s povišano telesno temperaturo, pojavlja se disurija, hematurija in pogosto uriniranje. Tako vnetje lahko povzroči povečano izločanje PSA v plazmo, ki običajno traja do šest tednov (4). Povzročitelji akutnega prostatitisa so običajno po Gramu negativne bakterije ali *Staphylococcus aureus*, ki je Gram pozitivna bakterije. Za ne-bakterijski prostatitis je značilna prisotnost znakov prostatitisa s številnimi levkociti v eksprimatu prostate, kultura seča pa je negativna (5).

Benigna hipertrofija prostate (BHP)

BHP je dolgotrajna, ne-maligna napredujoča bolezen, kjer je značilno povečana prostata, obstrukcija pretoka seča in subjektivne težave z mokrenjem. Ne-zdravljenje lahko privede do akutnega zastoja seča ali pa je potreben operacijski poseg. Pomembna dejavnika tveganja sta staranje in hormonsko neravnovesje. BHP se najpogosteje razvije iz prehodne cone. To je rastoči adenom (6).

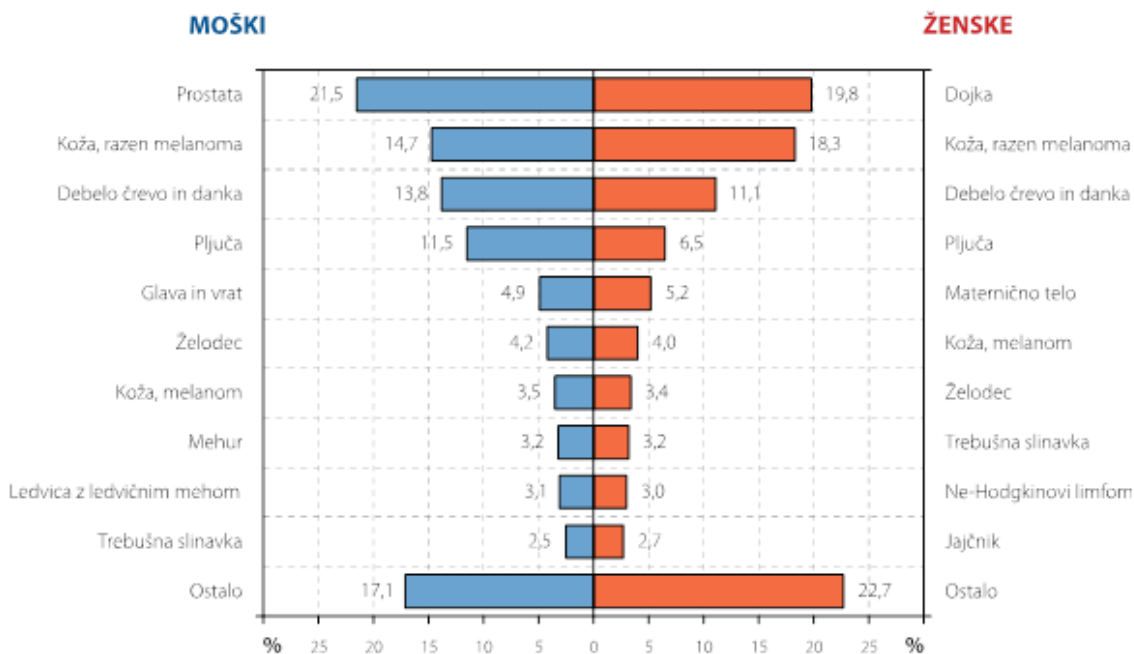
Rak oziroma karcinom prostate

Epidemiologija raka prostate.

Obolevnost in umrljivost za rakom prostate sta po svetu zelo različni. Tri četrtine novih primerov je iz ekonomsko razvitejših področij. V Evropski zvezi je bila leta 2012 ocenjena incidenca raka prostate največja v Skandinaviji, Franciji, najnižja pa v vzhodni Evropi. Rak prostate je najpogostejši rak pri moških v Sloveniji in svetu. V Sloveniji je bila v obdobju med 2006-2010 povprečna incidenca raka prostate 1171, kar predstavlja 21,5 % med vsemi raki pri moških, število smrti v enem letu 352. Povprečna groba incidenčna stopnja raka prostate pa 117/100000 moških. Groba in starostno standardizirana incidenčna

stopnja se v zadnjih 10 letih povečujeta, groba v povprečju za 7,6 %, starostno standardizirana pa v povprečju za 5,6% v obdobju zadnjih 10 let (7).

Karcinom prostate se klinično pojavi v štirih oblikah. Incidenčni karcinom, klinični karcinom, latentni karcinom in okultni karcinom (8).



Slika 2: Najpogostejša mesta raka po spolu v Sloveniji 2011 (7).

1.3. BOLEZENSKI ZNAKI RAKA PROSTATE

1.3.1. Najpogostejši simptomi

Bolezen se v več kot 80 % primerih kaže kot asimptomatska. V zgodnji fazi simptome raka prostate spremljajo simptomi benigne hiperplazije prostate (pogosto uriniranje, slaboten ali prekinjen tok urina, bolečina ali pekoč občutek med uriniranjem ter krvav seč). Nobeden izmed teh simptomov ni značilen samo za rak prostate, ampak se lahko pojavijo tudi pri moških, ki imajo benigno bolezen, kot je primer BHP. Simptomi v povezavi z urinom so lahko tudi posledica okužb ali drugih uroloških težav. V primeru, da se je rak razširil izven žleze v sosednje ali oddaljene organe se lahko pojavijo: bolečine v presredku, motnje v izločanju blata, motnje ejakulacije, bolečine v kosteh, hrbtenici, bokih, stegnih, ramenih ali drugih kosteh, splošna oslabelost z izgubo telesne teže in še drugi simptomi. Nobeden od teh simptomov ni značilen samo za rak prostate (9).

1.4. PRESEJANJE IN DIAGNOSTIKA RAKA PROSTATE

1.4.1. Presejanje

Presejanje je pregled asimptomatskih oseb z zvečanim tveganjem za neko bolezen. Cilj presejanja je zmanjšati smrtnost zaradi raka prostate in zvečati kakovost življenja. Za aktivno iskanje raka je smiselno, če so zagotovljeni sledeči pogoji:

- da imamo zanesljiv test za zgodnje odkrivanje raka,
- da poznamo učinkovito in varno zdravljenje,
- da odkrivanje in zdravljenje zmanjšuje obolevnost in smrtnost zaradi te bolezni.

V Sloveniji trenutno ne izvajamo programa za presejanje raka prostate. Nekatere države za presejanje raka prostate uporabljajo digitorektalni pregled prostate in meritev tPSA. Leta 2009 so bile zaključene dve randomizirane raziskave, ki so proučevale učinke presejanja raka prostate s testom PSA. ERSPC (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer), ki so potekala v nekaterih evropskih državah, ter PLCO (Prostate, Lung, Colorectal Ovarian), ki jo je izvajal US National Cancer Institute (ta se bo nadaljevala še 13 let). Avtorji za obe raziskavi omenjajo potrebo po nadaljnjih raziskavah, za oceno kakovosti življenja, zdravljenje in umrljivost zaradi raka prostate. Glede na rezultate preiskav ERSPC in PLCO je trenutni standard določitve PSA-ja v kombinaciji z DRP neinvaziven in lahko dostopen, vendar ni idealen za zmanjševanje umrljivosti. Bolj pomembna bo ugotovitev razlike v kvaliteti življenja med različnimi načini zdravljenja raka prostate (10).

1.4.2 Diagnostika raka prostate

Najpomembnejše metode za diagnostiko raka prostate so digitorektalni pregled prostate, merjenje serumskega tPSA in transrektalni ultrazvočni pregled prostate (TRUZ). Za dokončno diagnozo sta vedno potrebni biopsija in histopatološki pregled tkiva prostate.

Digitorektalni pregled prostate (DRP)

DRP prostate je še vedno najpreprostejši in najcenejši diagnostični poseg za odkrivanje raka prostate. Vendar je omejen na subjektivno presojo in zazna samo tipljive tumorje. Ker

incidenca raka prostate po 50. letu starosti raste, bi moral biti DRP prostate obvezen del splošnega kliničnega pregleda (11).

Merjenje serumskega prostatno specifičnega antigena (PSA)

PSA je v serumu v prosti in vezani obliki. Bolniki z rakom prostate imajo večjo koncentracijo vezanega PSA (cPSA) in manjše razmerje med prostim PSA in celotni PSA (%fPSA).

Transrektalni ultrazvok (TRUZ)

Zdravnik vstavi ultrazvočno sondo v rektum. Prostato pregleduje s pomočjo ultrazvočnih valov, ki se odbijajo od prostate. V primeru, da so tPSA ali DRP in TRUZ nenormalni, lahko s pomočjo biopsije potrdimo diagnozo raka (11).

Biopsija

Transrektalna ultrazvočno vodena biopsija prostate je edini način za postavitve diagnoze raka. Gre za odvzem bioptičnega tkiva prostate za pregled pod mikroskopom. Uporabljajo se različni vzorci punktata prostate. Tako lahko ugotovimo majhne netipne rake prostate, hkrati pa lahko ocenimo volumen, lokalizacijo, ter gradus raka prostate. Indikacije transrektalno ultrazvočno vodene biopsije prostate so: sumljiv DRP, tPSA višji od 3 µg/L in sumljiv izvid TRUZ (11). Kljub temu, da je transrektalna ultrazvočna vodena biopsija prostate zelo izboljšala diagnostiko raka prostata, ima svoje pomanjkljivosti. Incidenca lažno negativnih biopsij je med 19 in 23 %. Zato jo moramo pri negativnem izvidu in trajno zvečani koncentraciji tPSA ponoviti (12).

Patohistološke vrste rakov prostate

Patohistološka diagnostika raka prostate temelji na vrednotenju anaplazije jeder tumorskih celic, oceni invazije rašče in spremembah žleznega tkiva. Najvišji delež raka prostate predstavlja adenokarcinom. To je oblika raka, ki se razvije v žlezem tkivu prostate. Drugi pomembni tip raka prostate je drobnocelični anaplastični rak prostate, slednji večinoma prej razvije oddaljene zasevke in se razširi po telesu. Glede na stopnjo diferenciacije ločimo: dobro, zmerno, slabo diferenciran in nediferenciran rak prostate (13).

1.4.3. Preiskave za ugotavljanje razširjenosti in stadija raka prostate

- Računalniška tomografija (CT).
- Scintigrafija in rentgensko slikanje okostja (SPECT).
- Slikanje z magnetno resonanco (MRI).
- Pozitronska emisijska tomografija (PET-CT).

Pravilna ugotovitev stadija raka prostate je izredno pomembna, ker je potencialno ozdravljiv le rak, omejen na prostato. Pri določanju stadija uporabljamo metodo za klasifikacijo, imenovana TNM. Ta metoda omogoča opisovanje osnovnega tumorja ter obsega širitve raka v druge dele telesa. Metoda TNM nam določa stadij raka glede na (13):

- velikost tumorja (T)
- zasevkov v bezgavkah (N)
- razsoja tumorja v ostale dele telesa metastaze (M)

Ne glede na vrsto raka prostate je potrebno določiti tudi histopatološko stopnjo anaplazije oz. Gleasonov indeks-gradus (G). Na podlagi TNM in G klasifikacije opredelimo stadij bolezni.

- Stadij I: Rak je odkrit le v prostati, tumor je omejen na polovico prostate. Rak ni zajel lokalnih bezgavk ali oddaljenih organov. Rak stadija I večinoma vsebuje dobro diferencirane celice in naj bi rasel počasi (T1a, N0, M0, G1).
- Stadij II: Rak raste v prostati, vendar ni dokazov, da se je rak razširil izven prostate na bezgavke ali oddaljene organe (T1-3, N0, M0, katerikoli G).
- Stadij III: Rak se je razširil izven zunanje ovojnice prostate v bližnje tkivo. Lahko se je razširil tudi v seminalne vezikle (T3, N0, M0, katerikoli G).
- Stadij IV: Vsebuje katerikoli tumor, katerekoli stopnje malignosti (katerikoli G), ki se je razširil v druge dele telesa, kot so mehur ali rektum (T4, N0, M1); kosti, jetra, pljuča (katerikoli T, N0, M1) ali lokalne bezgavke (katerikoli T, N1, M0).

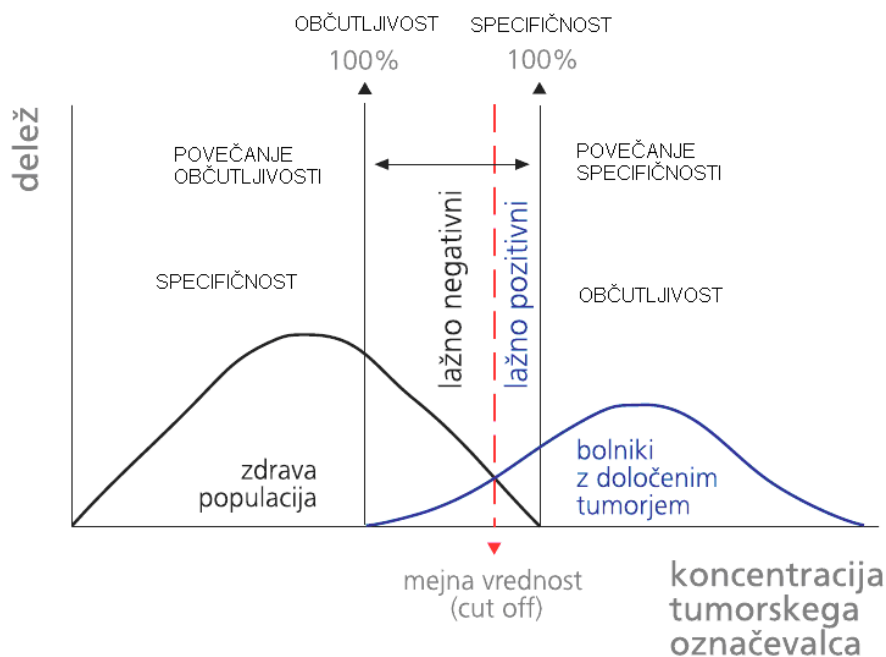
1.5. ZDRAVLJENJE KARCINOMA PROSTATE

Zdravljenje raka prostate je odvisno od velikosti in položaja tumorja ter razširjenosti bolezni in splošnega zdravstvenega stanja bolnika.

- **Aktivno opazovanje** stanja bolnika zdravniki izberejo na podlagi bolnikovih okoliščin in tudi njegovih želja, še posebej ko bi z agresivnim zdravljenjem lahko naredili več škode kot koristi. Uporabljajo ga predvsem upoštevajoč bolnikovo pričakovano življenjsko dobo in pridružene bolezni (9).
- **Kirurško zdravljenje** z radikalno odstranitvijo prostate (radikalna prostatektomija), pomeni kirurško odstranitev prostate in bezgavk v območju medenice.
- **Obsevanje** lahko poteka od zunanje strani z žarki (teleradioterapija), ali notranje strani (brahiradioterapija).
- **Hormonsko zdravljenje** lahko poteka z ustavitvijo nastajanja luteinizirajočega hormona (LH) z analogi LHRH, odstranitvijo mod, zavretjem delovanja androgenov ali zdravljenje s kortikosteroidi.
- **Kemoterapija** je uničevanje rakavih celic s pomočjo citostatikov (9).

1.6. TUMORSKI OZNAČEVALCI

Danes je določanje tumorskih označevalcev (TO) za spremljanje dinamike maligne bolezni uveljavljena onkološka laboratorijska metoda. TO so zanesljivi predvsem pri spremljanju dinamike zdravljenja in zgodnjem odkrivanju ponovitve bolezni. Najpomembnejše lastnosti idealnega TO so, da mora biti zelo specifičen za določeno vrsto tumorja, določljiv v serumu vseh bolnikov z istim tipom tumorja, določljiv na začetku razvoja tumorja, njegove serumske koncentracije, pa naj bi odražale dinamiko rasti tumorske mase. Poleg tega naj bi bile serumske koncentracije uporabne kot napovedni dejavnik poteka bolezni pri bolnikih z določenim tipom tumorja. Ker so TO, ki jih danes uporabljamo pogosto v telesnih tekočinah zdravih ljudi ali bolnikov z nemaligimi boleznimi, opisujemo uporabno vrednost TO za vrsto raka s pojmom diagnostična občutljivost in specifičnost. Idealen TO naj bi bil 100 % občutljiv in specifičen, njegova referenčna vrednost naj bi bila 0. Realno je referenčna vrednost postavljena tako, da dosežemo kompromis med občutljivostjo in specifičnostjo. Postaviti jo moramo tako, da imamo čim manj lažno negativnih in čim manj lažno pozitivnih rezultatov. Za potrditev maligne bolezni pri bolnikih nas predvsem zanima občutljivost testa manj, pa specifičnost (14). Visoka občutljivost je lastnost idealnega presejalnega testa, testi z visoko specifičnostjo naj bi se uporabljali kot diagnostični test (14).



Graf 1: Prikaz vpliva mejne vrednosti na specifičnost in občutljivost analita (14).

1.7. PROSTATNO SPECIFIČNI ANTIGEN (PSA)

Prostatno specifični antigen (PSA) je prvi odkril Hara s sodelavci v semenski tekočini leta 1971. Ta protein seminalne tekočine so označili kot gama-seminoprotein. Wang je leta 1979 iz tkiva prostate izoliral tkivno specifično snov, ki so jo poimenovali prostatno specifični antigen. Ker so bile ugotovljene pomembno višje koncentracije PSA v serumu pri bolnikih z napredovanim rakom prostate, je preiskava postala uporabna v diagnostične namene (15). Leta 1987 sta Papsidero in Stamey prva pričela klinično uporabljati PSA kot tumorski označevalec pri ugotavljanju raka na prostati (16). PSA sintetizirajo celice prostatičnih acinusov in duktalnega epitelija. V lumen prostatični duktusov se izloča po principu eksocitoze in nato postane sestavni del semenske tekočine, kjer služi za njeno utekočinjenje. V plazmo prehaja z difuzijo iz žleznih celic skozi epitelno bazalno membrano in prostatično stromo, ter nato preide skozi kapilarno bazalno membrano v krvni obtok (15). V letu 1994 je agencija FDA odobrila uporabo PSA testa za zgodnje odkrivanje raka na prostati.

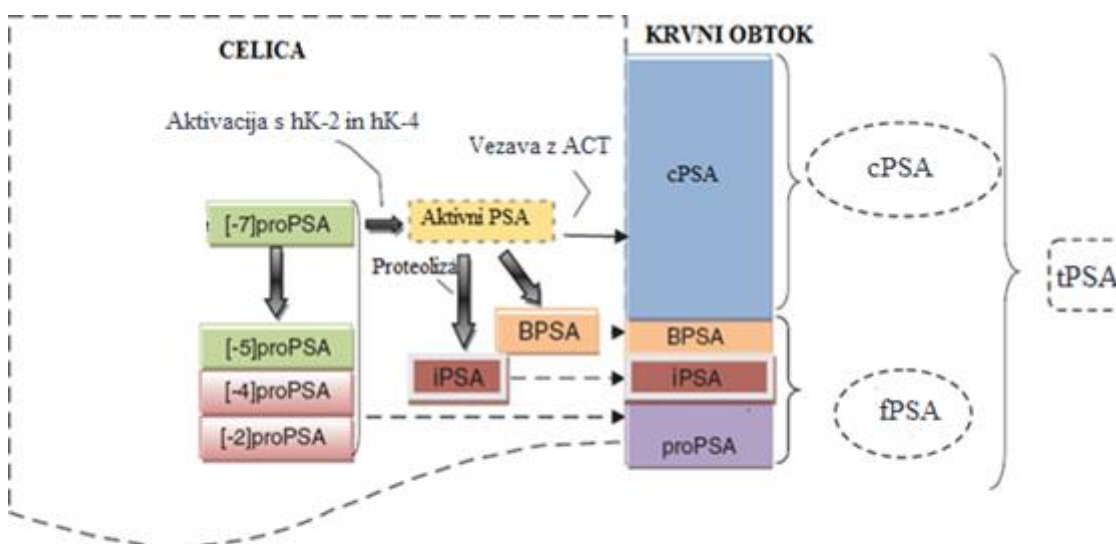
1.7.1. Določanja PSA

Cilj določanja PSA je zgodnje prepoznavanje in zmanjšanje obolevnosti ter umrljivosti zaradi raka prostate, ter spremljanje bolnikov pred in po zdravljenju PCa. Povišane vrednosti PSA so značilna za tri najpogostejše bolezni prostate: prostatitis, BHP in rak prostate. Pred meritvijo PSA se moramo seznaniti z bolnikovimi težavami. Ker na nivo PSA vplivajo različni dejavniki, kot so antibiotično zdravljenje prostatitisa, jemanje zaviralcev 5-alfa reduktaze, kirurška kastracija in kastracija z zdravili (jemanje LHRH agonistov, antiandrogenov). Digitorektalni pregled nima večjega vpliva na nivo PSA v krvi, za razliko od biopsije prostate, ki povzroča znaten porast PSA, kar traja še tri do šest tednov po biopsiji (17).

1.7.2. Biokemijske lastnosti PSA

PSA je glikoprotein iz skupine serinskih proteaz (EC 3.4.21.77) z molekularno maso 34 kDa. Gen, ki kodira PSA molekulo, je lociran na kromosomu 19q13.4. Transkripcijo PSA gena pozitivno regulirajo androgeni receptorji. PSA molekula je sestavljena iz verige 237 aminokislin, ki ima 4 stranske verige sestavljene iz ogljikovih hidratov povezanih preko aminokislin asparagin-serin-treonin-serin (18). PSA je poznan kot humani kalikrein hK3. Vsi humani kalikreini, so podobne genetske strukture in se nahaja v različnih tkivih, hK3 oz. PSA je visoko izražen v prostati, veliko manj v dojkah, ščitnici, žlezah slinavkah, pljučih in sapniku. Druga mesta nastanka PSA, razen prostate normalno ne vplivajo na koncentracijo PSA v krvi (19). V krvi je koncentracija PSA 10^6 -krat manjša kot v semenski tekočini. Tudi hK2 se nahaja v epiteliju prostate in se uporablja v imunohistokemiji za določanje stopnje karcinoma in metastaz limfnih vozlov. PSA kroži v serumu v prosti in vezani obliki. Približno 60 % do 90 % molekul PSA, ki prehaja v plazmo se veže v kompleks z zaviralci proteaz, opisujemo ga kot vezani »angl. complexed PSA« (cPSA). Velika večina PSA molekul se po prehodu v krvni obtok ireverzibilno vežejo na zaviralce proteaz α -1-antikemotripsin (ACT), v manjši meri se vežejo z α -2-makroglobulinom (A2M) in α -1-proteazni inhibitor (API). Kompleks PSA-ACT izgubi določene epitope PSA molekul, vendar določeno število antigenskih epitopov ostane razprostrti in je tudi glavna oblika, ki jo z imunskimi tehnikami analiziramo v serumu. α -

2-makroglobulin popolnoma veže PSA molekule, tako vezane PSA molekule na površini kompleksa nimajo več razprostrtih PSA antigeni epitopov in ga z imunskimi tehnikami ne moremo analizirati. Kljub 10^3 -krat večji koncentraciji ACT kot PSA je manjši del PSA molekul v plazmi v nevezani obliki, ta predstavlja v povprečju le 5% - 35% tPSA. Dokazano je bilo, da imajo bolniki s karcinomom prostate večjo koncentracijo tPSA v serumu in nižjo vrednost %fPSA. Ugotovljeno je bilo, da rakave celice prostate izdelujejo v večjih koncentracijah poleg PSA tudi ACT. Sinteza ACT in prehajanje v zunajcelični prostor, bi bil lahko eden od možnih vzrokov povišane koncentracije kompleksa PSA-ACT in manjšega razmerja %fPSA v plazmi pri bolnikih s PCa (19).



Slika 3: Molekulske oblike PSA (20).

1.7.3. Endogeni in eksogeni vplivi na koncentracijo PSA v plazmi

PSA se izloča iz epitelnih celic malignega in normalnega oz. benignega tkiva prostate. Večino PSA nastane v prehodni coni prostate. Razvoj ne-normalne žlezne strukture zaradi vnetja ali displazije vodi do povečanega izločanja PSA skozi področje vezivnih celic v vaskularni sistem (21). Koncentracija tPSA v serumu je normalno nizka, referenčne vrednosti so $< 4,0 \mu\text{g/L}$ (Hybritech standard) oz. $< 3,1 \mu\text{g/L}$ (WHO standard), povprečna vrednost znaša $1,15 \mu\text{g/L}$. Povišane koncentracije tPSA predstavljajo večjo verjetnost oz.

sum na PCa. Vendar zaradi slabe specifičnosti testa tPSA, klinična diagnostika PCa temelji na DRP in patohistološkem pregledu tkiva prostate. Karcinom prostate ni edini vzrok povečane koncentracije tPSA, ta se lahko spremeni bodisi zaradi starosti, rase, sezonskih razlik, vnetja, BHP in drugih benignih procesov. Koncentracija tPSA se spreminja s starostjo in se povečuje med šesto in sedmo dekada življenja, zato nekateri raziskovalci predlagajo uporabo referenčnih vrednosti, ki so korigirane s starostjo (22). DRP in TRUZ prostate imata manjši vpliv na koncentracijo tPSA v serumu, vendar kljub temu priporočajo odvzem krvi za določitev tPSA vsaj teden dni po pregledu (22). Po opravljeni biopsiji prostate, se priporoča odvzem krvi za meritev tPSA po 6-em tednu od opravljene biopsije. Bolezenska stanja, zaradi katerih se poveča koncentracija tPSA so poleg BPH in PCa še infarkt prostate, prostatitis, mehanski vplivi (masaža prostate, inštrumentalni posegi, retencija seča), vpliv zdravil in nepravilna presnova PSA (23). Koncentracijo PSA v plazmi lahko poveča tudi transuretralna resekcija prostate, nobenega vpliva na povišane vrednosti PSA pa nimata vstavljen kateter in ejakulacija (24). Nekatere druge raziskave, pa so potrdile, da se tPSA poveča tudi zaradi vpliva ejakulacije in v ta namen priporočajo spolno abstinenco pred določitvijo PSA-ja najmanj 24 ur (25). Koncentracijo tPSA lahko znižajo zdravila, ki jih uporabljamo za hormonsko zdravljenje raka prostate, primer je finasterid, ki je zaviralec encima 5-alfa-reduktaze. S svojim delovanjem preprečuje pretvorbo testosterona v dihidrotestosteron in po dolgotrajnem jemanju v odmerku 5mg dnevno zmanjša koncentracijo tPSA za 30 do 60 %, zato mora zdravnik vrednost tPSA pomnožiti z dva, da dobi približek realne vrednosti (26). Po kirurški odstranitvi prostate ali zdravljenju z obsevanjem se koncentracija tPSA v krvi zniža na minimalno vrednost. Razpolovni čas proteina je 2 do 3 dni (27).

1.7.4. Pomen povišane koncentracije tPSA

Trajno zvišana koncentracija tPSA v serumu je visoko občutljiv pokazatelj malignih sprememb prostate. Četudi je PSA tkivno specifičen, njegovo sproščanje ni specifično samo za rakave celice. Izdelujejo ga tudi normalne in hiperplastične celice prostate, ki ga izločajo v cirkulacijo (28). Tako se nivoji serumskega tPSA pri bolnikih z BPH in tistimi z zgodnjim, ozdravljivim rakom prostate precej prekrivajo. Problematične so vrednosti med 2,0 in 10,0 $\mu\text{g/L}$, kjer je specifičnost testa razmeroma slaba (29). Raziskave so pokazale, da se specifičnost testa povečuje z večanjem serumske koncentracije, vendar obenem pada

občutljivost in nasprotno. Specifičnost preiskave na podlagi PSA lahko zvečamo (30):

- Z gostoto PSA »angl. PSA density« (PSAD). PSAD izračunamo tako, da vrednost tPSA v serumu delimo z volumnom prostate.
- S hitrostjo PSA »angl. PSA velocity« (PSAV). Pri tej metodi ugotavljamo spremembo koncentracije tPSA v serumu v zaporednih časovnih obdobjih. tPSA se v daljšem časovnem obdobju le malo spreminja, ob prisotnosti PCa, pa so spremembe večje. PSAV večja od 0,75 $\mu\text{g/L}$, v enem letu pri bolnikih s koncentracijo tPSA manjšo od 10 $\mu\text{g/L}$, naj bi bila sumljiva za rak prostate.
- Z referenčno vrednostjo tPSA, prilagojeno starosti bolnikov. Pri mlajših bolnikih je vrednost tPSA manjša in se glede na starost bolnikov postopoma povečuje.
- Z meritvijo prostega PSA in določanjem razmerja %fPSA (30).

Zaradi visoke občutljivosti in izredno dobre korelacije s tumorsko maso ga uporabljamo za spremljanje bolnikov s PCa. Nekatere države meritev tPSA uporabljajo za presejanje moških starejših od 50 let, ki imajo več dejavnikov tveganja za razvoj PCa. Serumsko koncentracija tPSA nad 10 $\mu\text{g/L}$ na splošno velja, da odraža maligni proces. Težavna je interpretacija izvidov tPSA med 2,0 in 10,0 $\mu\text{g/L}$ (t.i. siva cona). Takrat si pomagamo z določanjem fPSA.

1.8. PROSTI PSA IN RAZMERJE fPSA/tPSA

Glede na patološki proces na prostati, so zabeležili statistično različne povprečne koncentracije med fPSA in tPSA. Ugotovili so, da je razmerje %fPSA višje pri moških, ki boleajo za BHP, kot pri moških obolelih za rakom prostate. Bolniki s PCa imajo večji delež kompleksno vezanega PSA z ACT, kakor tisti z BHP. Pojav manjše vrednosti %fPSA pri raku prostate si lahko razložimo z razmnoževanjem sekrecijskih celic prostate, ki poleg PSA izločajo tudi ACT. Računanje %fPSA (enačba 1) statistično poveča specifičnost za ugotavljanje prisotnosti raka prostate pri moških s koncentracijo tPSA (4 do 10 $\mu\text{g/L}$). Pomanjkljivost merjenja fPSA je in vitro nestabilnost pri sobni temperaturi in 4 $^{\circ}\text{C}$, kar zahteva previdno ravnanje s krvnimi vzorci. Ameriška organizacija za hrano in zdravila (FDA) je odobrila uporabo testa fPSA in izračuna %fPSA pri bolnikih nad 50 let, ki imajo koncentracijo tPSA med 4 in 10 $\mu\text{g/L}$ (31).

Enačba 1: $\%fPSA = fPSA/tPSA \times 100\%$

Preglednica I: Verjetnost PCa pri nizki koncentraciji tPSA in normalnik DRP (32).

PSA ($\mu\text{g/L}$)	Verjetnost PCa (%)	Verjetnost Gleason ≥ 7 PCa (%)
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

Preglednica II: Verjetnost PCa glede na koncentracijo tPSA, %fPSA in normalnim DRP (33).

PSA ($\mu\text{g/L}$)	Verjetnost PCa %	%fPSA %	Verjetnost PCa %
0-2	1	...	
2-4	15	...	
4-10	25	0 - 10	56
		10 - 15	28
		15 - 20	20
		20 - 25	16
		> 25	8
>10	>50		

1.9. [-2]proPSA (p2PSA)

Molekule fPSA obstajajo v vsaj treh oblikah, to so encimsko neaktivni predhodniki oblike PSA molekul: proPSA, benigni PSA (BPSA) in neaktivni PSA (iPSA). Za proPSA so s kliničnimi raziskavami ugotovili, da je značilno povišan pri karcinomu prostate, medtem ko sta BPSA in iPSA značilno povišana pri BHP. Glede na dolžino aminokislinskih ostankov molekule proPSA, so odkrili več izoformnih oblik proPSA (34). Začetno 244 aminokislinsko molekulo proPSA cepi humani kalikrien 2 in tripsin v aktivno molekulo encima PSA, ki ima končnih 237 aminokislin. Pri tem procesu, pa nastajajo tudi izoformne oblike proPSA z različnim številom ostankov aminokislin [-7]proPSA, [-5]proPSA, [-4]proPSA ali [-2]proPSA (p2PSA). Klinična uporabnost testa p2PSA temelji na prvotnih študijah imunohistokemije. Test p2PSA se je izkazal kot obetavni marker za odkrivanje raka prostate, ker je od naštetih najbolj stabilna molekula v plazmi in je bil ugotovljen v bistveno večjih koncentracijah pri histopatoloških preparatih raka prostate v primerjavi z BHP (35). Leta 2001 je Mikolajczyk dokazala, da so molekule prekuzorske oblike PSA bolj izražena v rakavih lezijah, medtem ko v normalnem tkivu iste prostate veliko manj. Dodatne študije so pokazale, da se p2PSA molekule omejeno izražajo predvsem v periferni coni prostate, iz katere se razvije glavnina PCa. Brez ali zelo šibko izražanje p2PSA molekul, so dokazali pri prehodni coni, kjer se razvije BHP (34). Ugotovili so, da je razmerje p2PSA napram fPSA (%p2PSA) izračunano po enačbi 2, boljši test za odkrivanje PCa kot parameter %fPSA, ko imajo preiskovanci koncentracijo tPSA med 2 do 4 µg/L in ne-sumljiv DRP (36). Leta 2004 so Mikolajczyk in sodelavci potrdili te prve rezultate in dokazali večjo uspešnost testa %p2PSA napram %fPSA pri opredeliti PCa, pri moških s koncentracijo tPSA med 4 -10 µg/L in %fPSA večjim od 25 % (37). Ugotovitve iz teh začetnih raziskav so bile potrjene leta 2008, ko so Sokoll in sodelavci dokazali, da je %p2PSA boljši napovedni marker za odkrivanja raka prostate v primerjavi s tPSA in %fPSA, zlasti v območju tPSA med 2 - 10 µg/L (38). Test Access Hybritech p2PSA je namenjen uporabi v kombinaciji z Access Hybritech tPSA in Access Hybritech fPSA, za izračun prostatičnega indeksa »angl. Beckman Coulter Prostate Health Index« (PHI) pri moških starejših od 50 let s koncentracijo tPSA med 2 - 10 µg/L in ne-sumljiv DRP. Za dokončno diagnostiko PCa je potrebna biopsija prostate (39).

Enačba 2: $\%p2PSA = p2PSA \div fPSA \times 100\%$

1.10. PHI »Prostate Healt index«

Po razvoju testa p2PSA so v podjetju Beckman Coulter razvili matematično formulo za izračun prostatičnega indeksa (PHI) (Enačba 3). Iz podatkov velike multicentrične klinične študije so izračunali relativno tveganje za PCa glede na rezultate PHI indeksa. Rezultati te študije so bili ključni pri utemeljitvi CE in FDA za odobritev novega testa p2PSA in PHI pri odkrivanju PCa. Pri izračunu PHI moramo uporabljati vrednosti tPSA, fPSA in p2PSA, ki so izmerjene istočasno na istem aparatu ob uporabi enakih kalibracijski standardov (WHO ali Hybritech) (40). PHI lahko uporabljamo za ugotavljanje verjetnosti raka prostate pri individualnih pacientih. Pomembno dejstvo je, da večja vrednosti PHI predstavljajo večjo verjetnost za rak prostate (preglednica XIX) (40). V magistrski nalogi bomo ocenili klinično uporabnost PHI, ter primerjali oceno verjetnosti za prisotnost karcinoma prostate pri preiskovancih, ki imajo nizko koncentracijo tPSA (2 do 10 μ g/L).

Enačba 3:
$$PHI = \frac{p2PSA}{fPSA} \times \sqrt{tPSA}$$

2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je statistično oceniti klinično uporabnost novega tumorskega označevalca prekursorja prostatno specifičnega antigena p2PSA in njegovih računskih derivatov %p2PSA in PHI v diagnostiki raka prostate pri bolnikih z nizko koncentracijo tPSA. V raziskavo bomo vključili skupino moških, ki bodo imeli serumsko koncentracijo tPSA v t.i. sivi coni med 2,0 in 10,0 $\mu\text{g/L}$. V uroloških ambulantah UKC Ljubljane in UKC Maribora bodo opravili odvzem venske krvi, DRP in biopsijo prostate. Rezultate meritev bomo na osnovi patohistološke diagnostike razdelili v dve skupini. V prvi skupini bodo podatki preiskovancev z ne-maligno spremembo prostate v drugi skupini, pa podatki bolnikov s potrjeno diagnozo raka prostate. Statistično bomo primerjali povprečne vrednosti parametrov med skupinama. Izračunali bomo zgornje meje referenčnih intervalov tumorskih označevalcev %fPSA, p2PSA, %p2PSA in PHI. S programoma SPSS in MedCalc bomo izvedli statistično analizo podatkov, na osnovi katere bomo ovrednotili diagnostično uporabnost, specifičnost in občutljivost tumorskih označevalcev p2PSA, %p2PSA in PHI, ter jih primerjali s tumorskim označevalcem %fPSA. Izračunali bomo verjetnost in relativno tveganje za PCa pri različnih intervalih PHI, ter jih primerjali z literaturo. Ugotoviti želimo ali lahko določanje %p2PSA in PHI prispevata k izboljšanju diagnostike raka prostate, pri bolnikih z nizko koncentracijo tPSA.

2.1. HIPOTEZE

V magistrski nalogi je bil naš namen preveriti naslednje hipoteze:

1. Vrednosti tumorskih označevalcev p2PSA, %p2PSA in PHI so značilno višje v skupini preiskovancev obolelih za rakom prostate.
2. Diagnostične vrednosti tumorskih označevalcev p2PSA, %p2PSA in PHI so višje od %fPSA.
3. Površina pod ROC krivuljo t.i. AUC tumorskih označevalcev p2PSA, %p2PSA in PHI so značilno višje od %fPSA.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

- **Vzorci seruma**
- **Analizator** Beckman Coulter Access2 Immunoassay
- **Reagenti** Access® Hybritech® za tumorski označevalec tPSA, fPSA ali p2PSA so že pripravljene. Pred prvo uporabo reagente vzamemo iz hladilnika in jih previdno nežno premešamo ter postavimo v prostor za reagente na analizatorju.

- R1a** Paramagnetni streptavidinski delci vezani z mišjimi monoklonalnimi protitelesi anti-(p2PSA, tPSA ali fPSA) v TRIS pufru soli s površinsko aktivnimi snovmi, goveji serumski albumin (BSA), < 0.1% natrijev azid in 0.1% ProClin 300

- R1b** Blocking reagent s citratom, sulfaktant, BSA, alkalna fosfataza, (mišji, goveji in kozji) proteini, < 0.1% natrijev azid in 0.1% ProClin 300

- R1c** Mišja monoklonalna protitelesa anti-PSA konjugirana z alkalno fosfatazo v fosfatnem pufru soli s površinsko aktivnimi snovmi, BSA, mišji proteini < 0.1% natrijev azid in 0.25% ProClin 300 (40).

- **Kalibrator** Access® Hybritech® za posamezni tumorski označevalec s 6 oz. 7 različnimi točkami. Kalibracije izvajamo ob vsakokratni uporabi novega reagenta, če so pretekli od prejšnje kalibracije več kot 4 tedne in če so vrednosti kontrole izven dovoljenih območji.
- **Kontrola** 3 nivojska (Access@ Hybritech® p2PSA, tPSA ali fPSA QC Kit), ki jo izvajamo vsak dan pred analizo vzorcev.
- **Pufer za izpiranje** (Access Wash Buffer II) je TRIS pufer raztopine s sulfaktantom in konzervansom, ki ga aparat uporablja za čiščenje pipet, spiranje nevezanih analitov in odvečnih reagentov v reakcijski kivetih od paramagnetnih delcev in kot diluent za redčenje vzorcev (40).
- Rokavice, pipete, nastavki za pipete in centrifuga

3.2. PRINCIP METODE

Za analizo vzorcev smo uporabljali analizator Beckman Coulter Access2 Immunoassay, ki uporablja kvantitativno metodo za ugotavljanje koncentracije tumorskih označevalcev tPSA, fPSA in p2PSA, s pomočjo katerih izračuna %p2PSA in PHI. Pomembno je, da meritve vseh 3 parametrov opravimo z istim sistemom kalibratorjev (Hybritech ali WHO) in z materiali istega proizvajalca. Metoda temelji na tehnologiji trdne faze, ki uporablja paramagnetne delce in kemiluminiscenčno detekcijo signala. Access Hybritech kalibracije, kontrole in vzorce humanega seruma smo analizirani s tako imenovano dvostransko imunoencimsko »sandwich« metodo.

Za vse tri parametre (tPSA, fPSA in p2PSA) je metoda enaka. Razlika je le v prvi fazi, ko aparat vzorec seruma odpipetira v reakcijsko kiveto, doda raztopino monoklonalnih mišjih protiteles anti-PSA konjugirane z alkalno fosfatazo in paramagnetne delce na katerih so vezane mišja monoklonalna protitelesa anti-(p2PSA, PSA ali fPSA), odvisno kateri analit merimo. Molekule (p2PSA, PSA ali fPSA) se iz vzorca vežejo na immobilizirane monoklonalne anti-(p2PSA, PSA ali fPSA) na trdni fazi, istočasno se monoklonalne anti-PSA-alkalna fosfataza veže na druge antigenske determinante molekul (p2PSA, PSA ali fPSA). V drugi fazi po inkubaciji in spiranju reakcijske kivete, aparat doda substrat Lumi-Phos® 530, ki reagira z alkalno fosfatazo vezano v konjugatu trde faze paramagnetnih delcev, Pri tem pride do emisije svetlobe, ki jo analizator z luminometrom izmeri. Emitirana svetloba je direktno proporcionalna koncentraciji analitov s serumu. Koncentracija analita je determinirana iz več točkovne kalibracijske krivulje (40).

3.2.1. Značilnosti metod

Merilna območja

- p2PSA 0,5 - 5000 ng/L
- tPSA 0,1 - 150 µg/L
- fPSA 0,01 - 20 µg/L

Analitična specifičnost

Analitična specifičnost testa je definirana kot zmožnost testa, da natančno zazna določen analit ob prisotnosti motečih dejavnikov v matriksu vzorca (npr. lipemija, hemoliza ali ikteričnost). Študije za nadzor potencialno motečih snovi so pokazale, da na izvajanje testov p2PSA, tPSA in fPSA ne vplivajo koncentracije konjugiranega in nekonjugiranega bilirubina < 200 mg/L, hemoglobina < 5g/L, trigliceridov < 15g/L, albumina < 60 g/L in celokupnega proteina < 84 g/L.(40)

3.2.2. Postopek testiranja

Analizator Beckman Coulter Access2 Immunoassay omogoča skoraj popolnoma avtomatiziran postopek. Pred začetkom testiranja smo izvedli kalibracijo in kontrolo kakovosti posameznega analita. Preverili smo vzorce in jih namestili v stojalo.

1. Za enkratno določitev parametra p2PSA analizator potrebuje 50 μ L seruma, za določitev parametra tPSA 25 μ L in fPSA 25 μ L + 150 μ L (nefunkcionalen volumen). Torej za enkratno meritev vseh treh parametrov potrebujemo minimalno 250 μ L seruma.
2. Preverimo količino reagentov, pufru za izpiranje in substrata. Pred prvo uporabo reagentov jih nežno premešamo ter postavimo v analizator.
3. Izberemo analize na ekranu analizatorja za parameter p2PSA, tPSA in fPSA.
4. Po končani reakciji analizator avtomatsko izračuna končne rezultate za parameter %fPSA in PHI.
5. Na koncu odstranimo kalibratorje, kontrole ali vzorce iz analizatorja in jih hranimo v hladilnik ali zamrzovalnik.
6. Z vsemi biološkimi materiali smo ravnali kot z možno infektivnimi. Po uporabi smo odpadni material odstranili v zabojnik za zbiranje bioloških odpadkov.

3.2.3. Stabilnost p2PSA, fPSA in tPSA

Za določitev parametrov tPSA, fPSA in p2PSA se uporablja serum preiskovancev. Vzorce venske krvi moramo odvzeti v epruvete brez antikoagulanta pred DRP, TRUS ali biopsijo prostate. V roku 3 ur po odvzemu krvi vzorce centrifugiramo, serum odpipetiramo in hranimo do analize v sekundarnih epruvetah brez dodatkov. Serum lahko hranimo do 24 ur na sobni temperaturi ali v hladilniku na temperaturi 2 do 8°C, za daljše obdobje, pa vzorce zamrzujemo na -20°C ali -70°C. Dvojno zamrzovanje vzorcev seruma nima vpliva na izmerjeno koncentracijo analitov (27).

3.3. ZBIRANJE PREISKOVANCEV IN VZORCEV

Vzorci krvi in rezultati so bili zbrani v okviru raziskave (RECAF tumorski označevalec pri bolnikih z rakom prostate), ki jo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko dne 21.11.2009, št. 98/10/2009. V raziskavo smo vključili 115 preiskovancev. Najmlajši je bil star 45 let, najstarejši 83 let, vsi so imeli predhodno koncentracijo tPSA med 2 in 10 µg/L. Preiskovancem smo odvzeli vzorce venske krvi v epruvete brez antikoagulanta. V roku treh ur po odvzemu smo epruvete centrifugirali, serume odpipetirali v sekundarne epruvete in jih do analize zamrznili pri -20°C. Iz vseh vzorcev smo v laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev UKC Ljubljana na analizatorju Beckman Coulter Access2 Immunoassay izmerili koncentracije Hybritech (tPSA, fPSA in p2PSA). Za nadaljnjo analizo podatkov smo upoštevali samo vrednosti preiskovancev, ki so imeli tPSA med 2,0 in 10,0 µg/L. Preiskovancem smo po odvzemu krvi v uroloških ambulantah UKC Ljubljana in UKC Maribor naredili še DRP, ultrazvok prostate, ter za potrditev prisotnosti PCa še biopsijo prostate s patohistološko analizo bioptičnega materiala, na podlagi katerega smo rezultate meritev razvrstili v dve skupini. V prvo skupino smo razvrstili vse podatke preiskovancev z ne malignimi boleznimi prostate (npr. BHP, atrofijo, vnetjem). V drugo skupino, pa podatke preiskovance s potrjenim PCa. Od 103 preiskovancev s koncentracijo tPSA med 2,0 do 10µg/L je bilo pri 31 preiskovancih potrjen karcinom prostate. Za kontrolno skupino, smo uporabili meritve 79 zdravih preiskovancev. Iz vseh meritev smo nato izračunali %fPSA, %p2PSA, PHI in PSAD.

4. REZULTATI

4.1. POTEK OBDELAVE PODATKOV IN STATISTIČNE METODE

Na začetku smo izločili vrednosti preiskovancev, ki so imeli koncentracijo tPSA nižjo od 2,0 in višjo od 10,0 $\mu\text{g/L}$. Podatke iz preglednic XXIV, XXV smo nato statistično ovrednotili.

V prvi fazi smo naredili opisno statistiko vsakega posameznega parametra. Nato smo podatke razdelili v dve skupine glede na histopatološki izvid tkiva prostate. Za testirane porazdelitve podatkov smo uporabili Shapiro-Wilkov in Kolmogorov-Smirnov test in se na osnovi tega v nadaljevanju odločili za uporabo ustreznih neparametričnih statističnih testov.

V drugi fazi smo statistično analizirali hipotezo o enakosti povprečji dveh neodvisnih vzorcev med skupinama za parametre tPSA, %fPSA, p2PSA, %p2PSA, in PHI. Uporabili smo Wilcoxon-ov test vsote rangov oz. Mann-Whitney U test za neodvisne vzorce.

V tretji fazi smo iz kontrolni skupine izračunali zgornjo mejo referenčnih vrednosti novih tumorskih označevalcev, na osnovi katerih smo izračunali občutljivost, specifičnost, napovedno vrednost in učinkovitost testov. Specifičnost in občutljivost testov smo prikazali s krivuljo občutljivosti in specifičnosti oz. tako imenovano ROC krivuljo. Izračunali smo površino pod ROC krivuljo AUC » angl. area under the ROC curve«, ki nam pove verjetnost, da bomo s testom pravilno ločili preiskovance med skupino s PCa in tiste z benigno spremembo prostate. Za posamezni tumorski označevalcec smo s pomočjo Youden indeksa določili optimalno referenčno vrednost »cut-off«. Izračunali smo verjetnost relativnega tveganja za PCa pri različnih intervalih PHI, ter jih primerjali s priporočili proizvajalca testov. Preverili smo ali bi lahko z uporabo novih tumorskih označevalcev %p2PSA in PHI znižali število nepotrebnih biopsij. Na koncu, pa smo izračunali še moč povezave oz. korelacijo med parametri.

Rezultate smo primerjali s tPSA in %fPSA, ter na podlagi pridobljenih podatkov ugotovili uporabnost novih testov za diagnostiko PCa v klinični praksi, pri bolnikih z nizko koncentracijo tPSA med 2,0 in 10,0 $\mu\text{g/L}$.

Pri testiranju smo upoštevali stopnjo tveganja $\alpha = 0.05$. ($p < 0,05$ pomeni statistično značilnost). Za analizo podatkov smo uporabili programe, Microsoft Excel, IBM SPSS statistics 23 in MedCalc 14.

4.2. OPISNA STATISTIKA

Preglednica III: Opisna statistika vseh podatkov.

	N	Srednja vrednost	95% CI	Mediana	95% CI
tPSA	103	4,76	4,4 - 5,1	4,35	3,9 - 4,8
fPSA	103	0,77	0,69 - 0,85	0,66	0,6 - 0,7
%fPSA	103	16,88	15,2 - 18,5	15,63	14,4 - 16,5
p2PSA	103	12,59	11,1 - 14,0	10,77	9,8 - 12,5
%p2PSA	103	1,82	1,64 - 2,01	1,67	1,54 - 1,86
PHI	103	40,21	36,0 - 44,3	36,07	32,4 - 38,9
Leto Rojstva	103	1948,2	1947 - 1949	1949	1947 - 1949

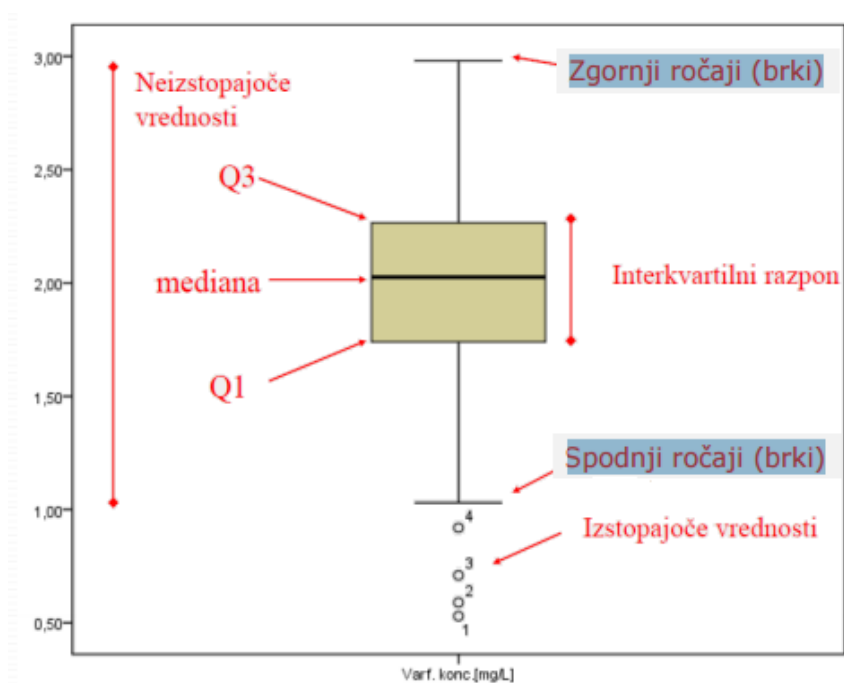
Preglednica IV: Opisna statistika posameznih parametrov pri skupini preiskovancev z ne-malignimi obolenji prostate in skupini s potrjenim PCa.

	Zdravi				Oboleni PCa			
	N	Srednja vrednost	Mediana	95% CI	N	Srednja vrednost	Mediana	95% CI
tPSA	72	4,56	4,31	3,8 - 4,8	31	5,22	4,39	3,88- 5,6
fPSA	72	0,79	0,68	0,6 - 0,8	31	0,72	0,63	0,5 - 0,7
%fPSA	72	18,01	16,31	14,7-18,0	31	14,25	13,33	11,3 - 15,9
p2PSA	72	11,36	10,27	8,96- 12,2	31	15,43	13,24	10,4 - 16,0
%p2PSA	72	1,62	1,53	1,33 - 1,67	31	2,29	2,37	1,97 - 2,86
PHI	72	35,55	32,67	29,3-36,5	31	51,01	51,40	39,4 - 62,5
Leto Rojstva	72	1949,2	1949,0	1948-1950	31	1945,8	1946,0	1942 - 1948

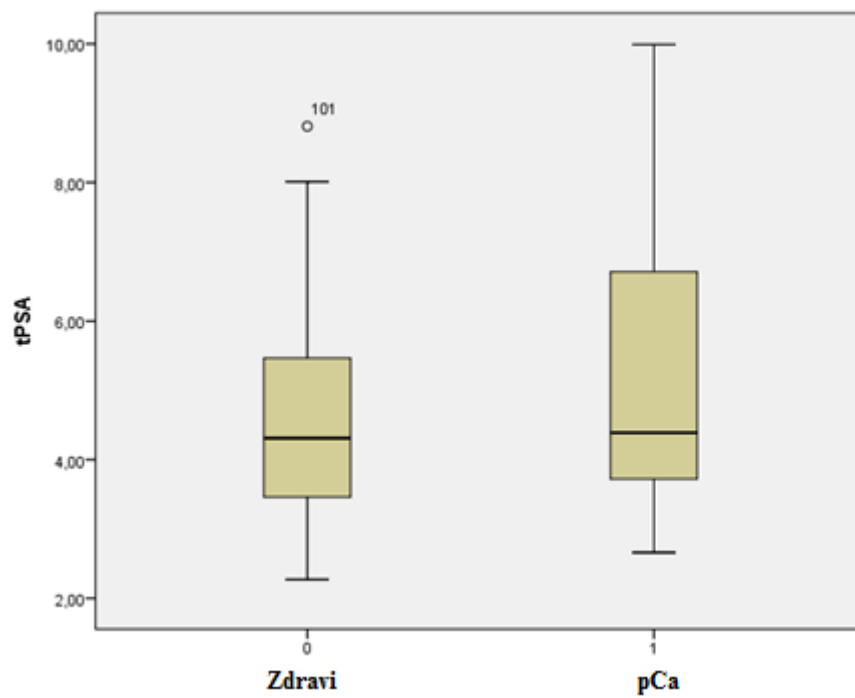
4.3. TESTIRANJE NORMALNE PORAZDELITVE

Kvantilni diagram

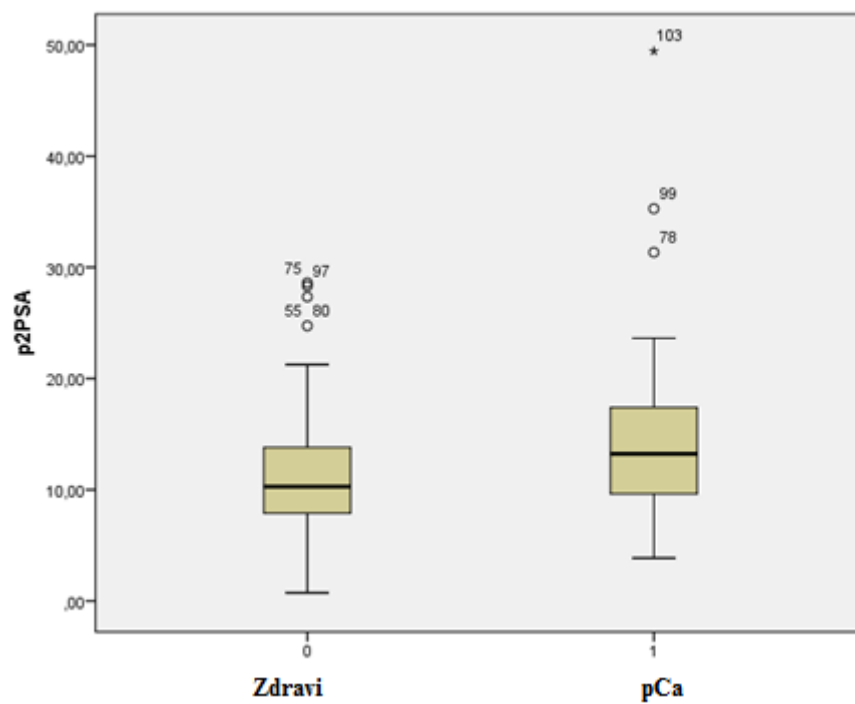
Kvantilni diagram je neparametrična mera za razpršenost oziroma variiranje podatkov. V magistrski nalogi smo uporabljali kvartilni diagram pri katerem prvi kvartil (Q1) predstavlja 25 % vseh podatkov z najnižjimi vrednostmi, drugi kvartil je mediana, tretji kvartil (Q3) pa 75 % vseh podatkov vrednosti.



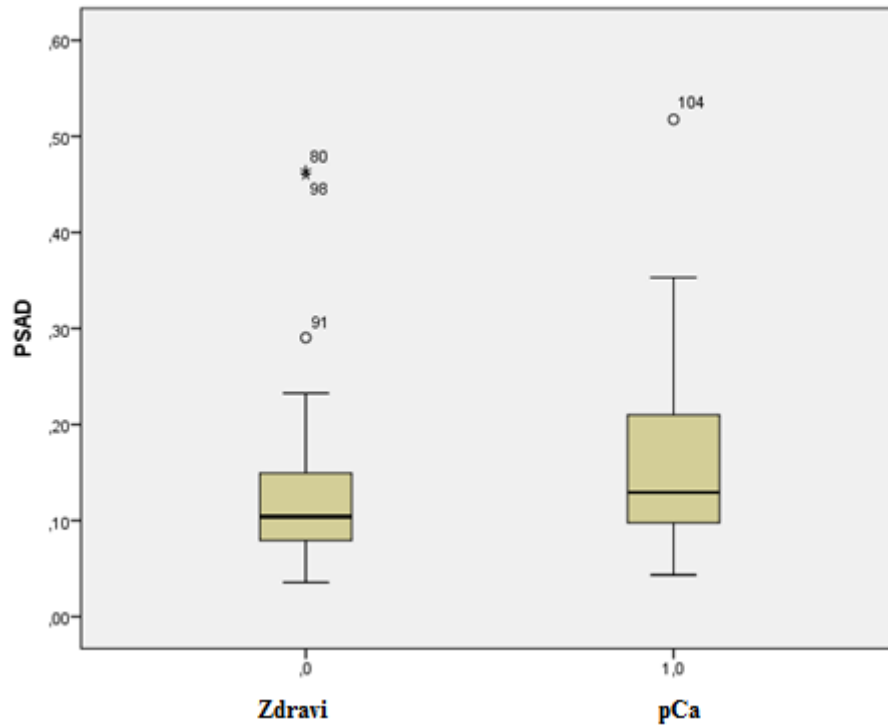
Slika 4: Prikaz kvartilnega diagrama (41).



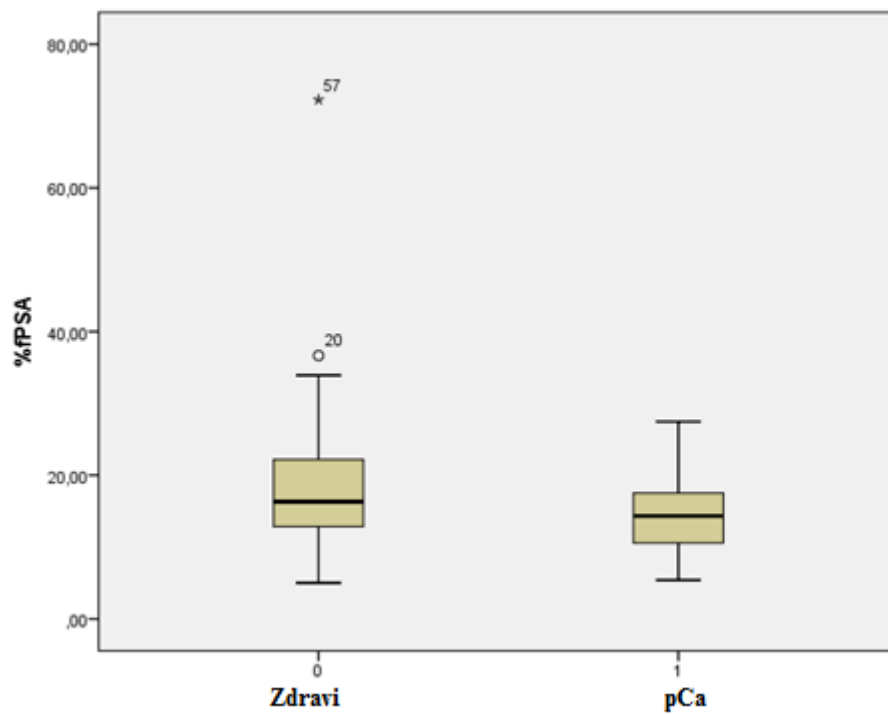
Graf 2: Kvartilni diagram za parameter tPSA.



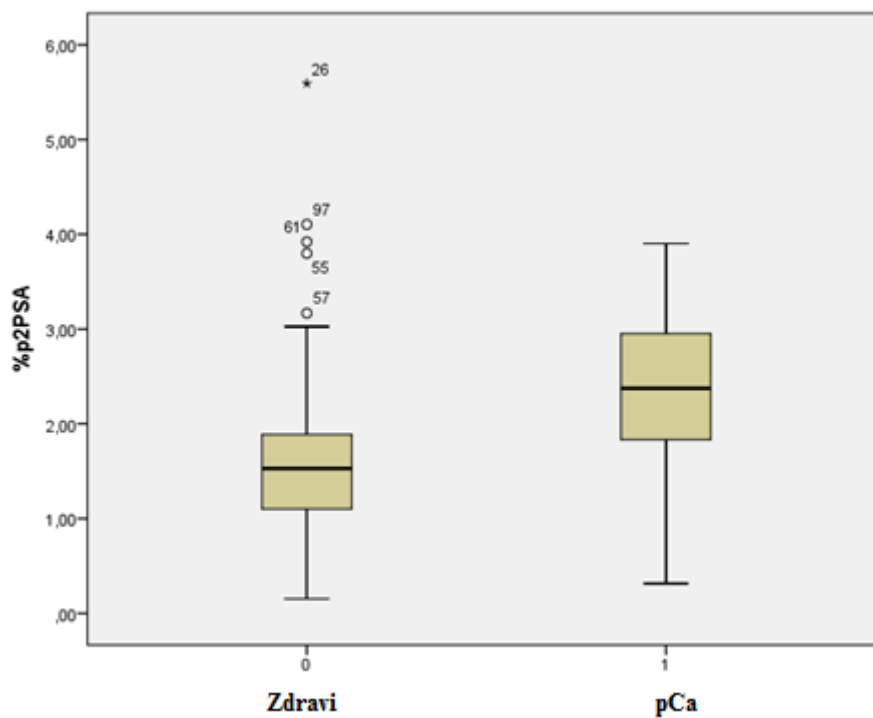
Graf 3: Kvartilni diagram za parameter p2PSA.



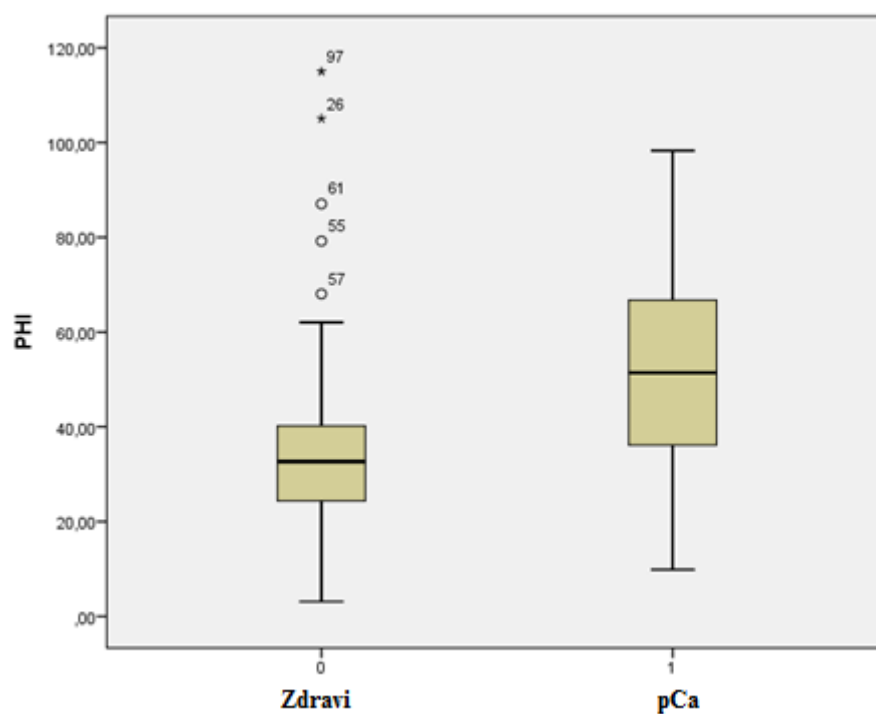
Graf 4: Kvartilni diagram za parameter PSAD.



Graf 5: Kvartilni diagram za parameter %fPSA.



Graf 6: Kvartilni diagram za parameter %p2PSA.



Graf 7: Kvartilni diagram za parameter PHI.

Temeljnega pomena za nadaljnjo obdelavo podatkov je testiranje porazdelitve, saj so statistični testi razdeljeni na osnovi tega kako se podatki porazdeljujejo. Normalno porazdelitev podatkov lahko preverimo na več načinov.

- Izris histograma, ki je v veliko pomoč, v primeru kadar je prisotna nenormalna porazdelitev, če že na pogled odstopa od normalne porazdelitve.
- Najpogostejši statistični test v biomedicini je Shapiro-Wilkov (manj kot 50 vzorcev) in Kolmogorov-Smirnov test (več kot 50 vzorcev). Katerega izberemo je odvisno od števila vzorcev.

S pomočjo obeh testov ugotavljamo korelacijo med normalno porazdelitvijo podatkov in našimi podatki. Pri obeh testih dobimo p oz. signifikantno vrednost, ki jo primerjamo z α vrednostjo (stopnja tveganja). Praviloma je stopnja tveganja v biomedicini 5%. Test izvedemo tako, da testiramo hipotezi:

H_0 : Razlike med porazdelitvijo podatkov naše populacije in populacijo z normalno porazdelitvijo ni.

H_1 : Obstaja razlika med porazdelitvijo podatkov naše populacije z normalno porazdelitvijo.

Če je p oz. signifikanca večja od 0,05 privzamemo ničelno hipotezo (H_0) in so podatki normalno porazdeljeni. Če je p oz. signifikanca manjša od 0,05 sprejmemo alternativno hipotezo (H_1) in so podatki nenormalno porazdeljeni. S pomočjo kvartilnih diagramov smo predhodno preverili prisotnost osamelcev, nato smo s pomočjo SPSS programa dobili naslednje izračune.

Preglednica V: Rezultati testiranja normalnosti porazdelitve podatkov.

		Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Statistic	N	Sig.	Statistic	N	Sig.
tPSA	Zdravi	0,093	72	0,197	0,951	72	0,007
	PCa	0,174	31	0,018	0,896	31	0,006
fPSA	Zdravi	0,127	72	0,006	0,789	72	<0,0001
	PCa	0,197	31	0,004	0,865	31	0,001
p2PSA	Zdravi	0,112	72	0,025	0,931	72	0,001
	PCa	0,199	31	0,003	0,794	31	<0,0001
%fPSA	Zdravi	0,137	72	0,002	0,780	72	<0,0001
	PCa	0,144	31	0,102	0,952	31	0,179
%p2PSA	Zdravi	0,149	72	<0,0001	0,882	72	<0,0001
	PCa	0,128	31	0,200	0,959	31	0,279
PHI	Zdravi	0,193	72	<0,0001	0,850	72	<0,0001
	PCa	0,076	31	0,200	0,991	31	0,996
PSAD	Zdravi	0,165	72	<0,0001	0,758	72	<0,0001
	PCa	0,205	31	0,002	0,845	31	<0,0001

4.3. TESTI ZA PRIMERJAVO POVPREČJA DVEH NEODVISNIH VZORCEV

Wilcoxon-ov test vsote rangov oz. Mann-Whitney U test

Ker se skoraj vse skupine porazdeljujejo nenormalno smo uporabili Wilcoxonov test vsote rangov za primerjavo povprečja dveh neodvisnih vzorcev. SPSS program nam najprej opredeli vsoto rangov in povprečje rangov. Sprva ugotovimo ali se povprečna ranga med seboj statistično razlikujeta. Pri izpisku SPSS programa dobimo Mann-Whitney U vrednost in vrednost Wilcoxonove vsote rangov W.

Rezultat W je statistično značilen, če je p oz. signifikanca (2 - smerni test) $< 0,05$.

Postavili smo hipotezi:

- H_0 : Razlike v povprečnih vrednostih vzorcev skupine z ne-malignimi obolenji prostate in skupine s potrjenim PCa niso statistično značilne oz. so nesignifikantne.
- H_1 : Razlike v povprečnih vrednostih vzorcev skupine z ne-malignimi obolenji prostate in skupine s potrjenim PCa so statistično značilne oz. so signifikantne.

Preglednica VI: Rezultati Wilcoxonove vsote rangov W.

		N	Povprečje rangov	Vsota rangov
PSA	benigni	72	49,5	3565
	PCa	31	57,7	1791
%p2PSA	benigni	72	44,2	3184
	PCa	31	70,0	2172
p2PSA	benigni	72	47,4	3413
	PCa	31	62,6	1942
PHI	benigni	72	44,9	3233
	PCa	31	68,4	2123
%fPSA	benigni	72	56,0	4038
	PCa	31	42,5	1318

Preglednica VII: Reultati Mann-Whitneyvega testa za parametre tPSA, %p2PSA, p2PSA, PHI in %fPSA.

	tPSA	%p2PSA	p2PSA	PHI	%fPSA
Mann-Whitney U	937	556	785	605	822
Z	-1,28	-4,02	-2,37	-3,67	-2,11
Sig.(p)	0,198	<0,0001	0,017	<0,0001	0,035

Če je p oz. signifikanca večja od 0,05 privzamemo ničelno hipotezo (H_0). Če je p oz. signifikanca manjša od 0,05 sprejmemo alternativno hipotezo (H_1)

4.4. DOLOČANJE REFERENČNIH INTERVALOV

Za določanje referenčnih intervalov %fPSA, p2PSA, %p2PSA in PHI smo uporabili statistični program MedCalc 14.8. Referenčni interval za določeno meritev smo opredelili kot napovedni interval med katerimi je 95% vrednosti referenčne skupine, ostalih 5 % vrednosti se porazdeli nad mejo referenčnega intervala. Ker smo imeli v kontrolni skupini 79 vzorcev smo uporabili t.i. »Robust method«, ki se uporablja za izračun referenčnega intervala ko imamo manj kot 120 vzorcev (42).

Preglednica VIII: Zgornje meje referenčnih intervalov za parametre %fPSA, p2PSA, %p2PSA in PHI.

	%fPSA (%)	p2PSA (ng/L)	PHI	%p2PSA (%)
Zgornja meja referenčnega intervala	7,87	19,81	63,8	3,04
95 % interval zaupanja	6,8 - 9,2	17,8 - 21,8	54,9 - 71,7	2,7 - 3,4

4.5. DIAGNOSTIČNE VREDNOSTI TESTOV

Diagnostično vrednost testov vrednotimo s:

Specifičnostjo: odstotek preiskovancev, ki nimajo določene bolezni in imajo koncentracijo spremljenega analita znotraj referenčnega intervala. (%) = $[RN/(RN+LP)] \times 100$

Občutljivostjo: odstotek bolnikov z določeno boleznijo, ki imajo patološke koncentracije spremljanega analita. (%) = $[RP / (RP + LN)] \times 100$

Napovedna vrednost pozitivnega testa: Verjetnost, da ima oseba bolezen, če je diagnostični test pozitiven. (%) = $[RP / (RP + LP)] \times 100$

Napovedna vrednost negativnega testa: Verjetnost, da oseba nima bolezni, če je diagnostični test negativen. (%) = $[RN / (RN + LN)] \times 100$

Učinkovitost testa: celotni odstotek pravilno pozitivnih in negativnih vrednosti od celotnega prebivalstva oz. kakšna je verjetnost, da bomo dobili pravilen rezultat.

(%) = $[(RP + RN) / (RP + RN + LP + LN)] \times 100$

Specifičnost pove, kako dobro negativni rezultat testa napove dejansko zdrave oz. delež negativnih na testu med resnično zdravimi. Občutljivost (senzitivnost) pa pove, kako dobro pozitivni rezultat napove dejansko bolne oz. delež pozitivnih na testu med resnično bolnimi. Specifičnost in občutljivost testa lahko spreminjamo s premikom razmejivne vrednosti za pozitiven rezultat. Seveda pa z večanjem specifičnosti zmanjšujemo občutljivost testa in obratno. Najobčutljivejši testi so uporabni za zaznavanje določene bolezni, saj je število lažno negativnih rezultatov minimalno. Visoka občutljivost je tudi dobra lastnost presejalnega testa, vendar je za namene presejanja potrebno, da je test tudi zelo specifičen. V nasprotnem primeru namreč s testom najdemo veliko število oseb s pozitivnim testom, ki nimajo bolezni, kar nam naredi precej dela z izključevanjem bolezni. Testi z visoko specifičnostjo so uporabni kot potrditveni diagnostični testi, ker nam dajejo minimalno število lažno pozitivnih rezultatov (43).

Z zelo občutljivim testom bomo z večjo verjetnostjo ovrgli bolezen, če bo test negativen. Z zelo specifičnim testom bomo lahko z večjo verjetnostjo potrdili bolezen, če bo test pozitiven.

Za izračun diagnostičnih vrednosti testov smo uporabili 2 X 2 kontingenčno tabelo. Tabela nam omogoča, da na osnovi referenčne vrednosti, meritve razporedimo na pozitivne ali negativne. To velja, ko predhodno z drugo referenčno metodo opredelimo, katere meritve

spadajo v določeno kategorijo. V našem primeru smo z biopsijo in histopatologijo vzorca prostate preiskovance razvrstili v skupino s karcinomom prostate ali v skupino brez karcinoma. Na osnovi zgornjega referenčnega intervala posameznega tumorskega markerja smo opredelili skupine kontingenčne tabele.

Preglednica IX: Kontingenčna tabela za izračun diagnostične vrednosti parametra p2PSA.

		Rezultat testa p2PSA		
		Pozitivni	Negativni	Vsi
Potrjen PCa	DA	RP=6	LN=25	RP+LN= 31
	NE	LP=6	RN=66	LP+RN= 72
	Vsi	RP+LP=12	LN+RN= 91	

Legenda: RP - resnično pozitivni, LN – lažno negativni, RN- resnično negativni, LP - lažno pozitivni.

Preglednica X: Kontingenčna tabela za izračun diagnostične vrednosti parametra %p2PSA.

		Rezultat testa %p2PSA		
		Pozitivni	Negativni	Vsi
Potrjen PCa	DA	RP=7	LN=24	RP+LN= 31
	NE	LP=5	RN=67	LP+RN= 72
	Vsi	RP+LP=12	LN+RN= 91	

Preglednica XI: Kontingenčna tabela za izračun diagnostične vrednosti PHI.

		Rezultat testa PHI		
		Pozitivni	Negativni	Vsi
Potrjen PCa	DA	RP=10	LN=21	RP+LN= 31
	NE	LP=5	RN=67	LP+RN= 72
	Vsi	RP+LP=15	LN+RN= 87	

Preglednica XII: Rezultati izračunov diagnostičnih vrednosti parametrov %fPSA, p2PSA, %p2PSA in PHI pri zgornji meji referenčnega intervala.

	%fPSA	p2PSA	%p2PSA	PHI
Diagnostična občutljivost (%)	9,7	19,3	22,6	32,2
Diagnostična specifičnost (%)	94,4	91,7	93,0	93,0
Napovedna vrednost pozitivnega testa (%)	42,8	50,0	58,3	66,7
Napovedna vrednost negativnega testa (%)	70,8	72,5	73,6	77,0
Učinkovitost testa (%)	68,9	69,9	71,8	74,7

4.6. ROC KRIVULJE - PRIMERJAVA DIAGNOSTIČNIH TESTOV

S pomočjo SPSS programa smo izrisali ROC krivulje in izračunali površine pod ROC krivuljami (AUC). AUC nam daje verjetnost, da bo določen test pravilno ločil pozitivne od negativnih, v našem primeru bolnike s PCa od zdravih. S pomočjo površine pod krivuljo lahko določimo diagnostično zanesljivost in uporabnost testa (44):

AUC 0,90 - 1,00 = izvrsten test

0,80 - 0,90 = dober test

0,70 - 0,80 = srednje dober test

0,60 - 0,70 = slabši test

Preglednica XIII: Podatki AUC za vse parametre pri vrednosti tPSA od 2,0 do 10,0 µg/L.

	Površina pod ROC krivuljo (AUC)	95% CI	Sig. (p)
tPSA	0,580	0,45 - 0,70	0,198
%fPSA	0,632	0,51 - 0,74	0,035
%p2PSA	0,751	0,64 - 0,85	<0,0001
PHI	0,729	0,61 - 0,84	<0,0001
p2PSA	0,648	0,53 - 0,76	0,017
PSAD	0,634	0,51 - 0,75	0,032
Volumen prostate	0,391	0,26 - 0,51	0,081

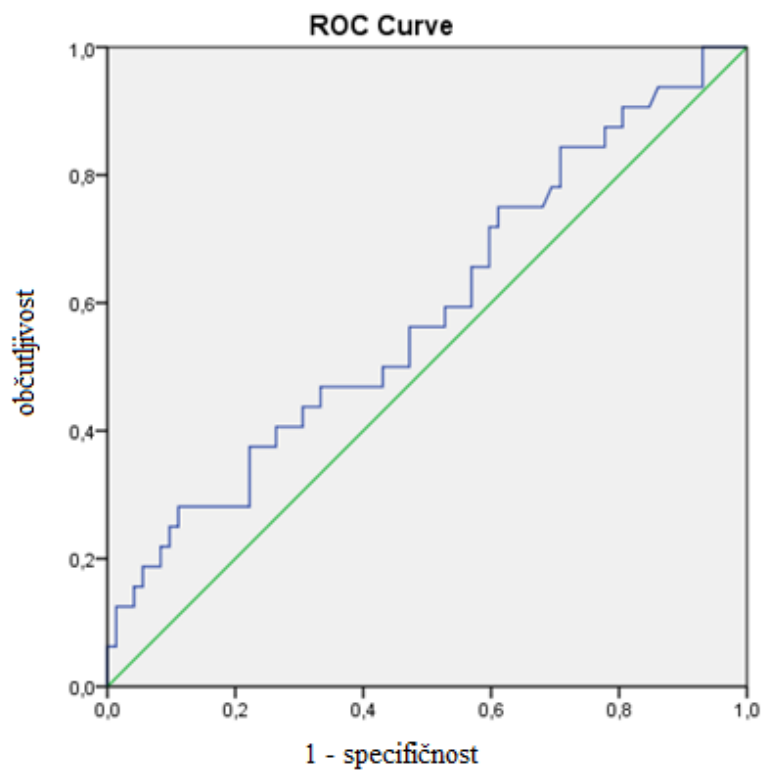
Statistično smo primerjali razlike med AUC testa %fPSA napram %p2PSA, PHI in p2PSA.

Postavili smo hipotezi:

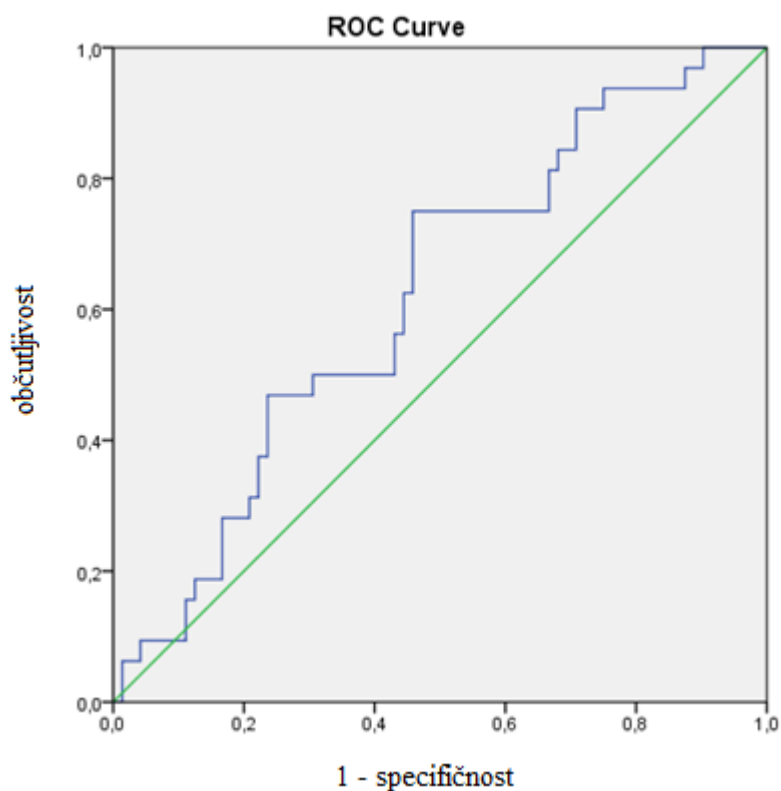
- H_0 : Razlike med AUC %fPSA in ostalimi testi niso statistično značilne oz. so nesignifikantne.
- H_1 : Razlike med AUC %fPSA in ostalimi testi so statistično značilne oz. so signifikantne.

Preglednica XIV: Statistična primerjava AUC %fPSA napram parametrom %p2PSA, PHI in p2PSA.

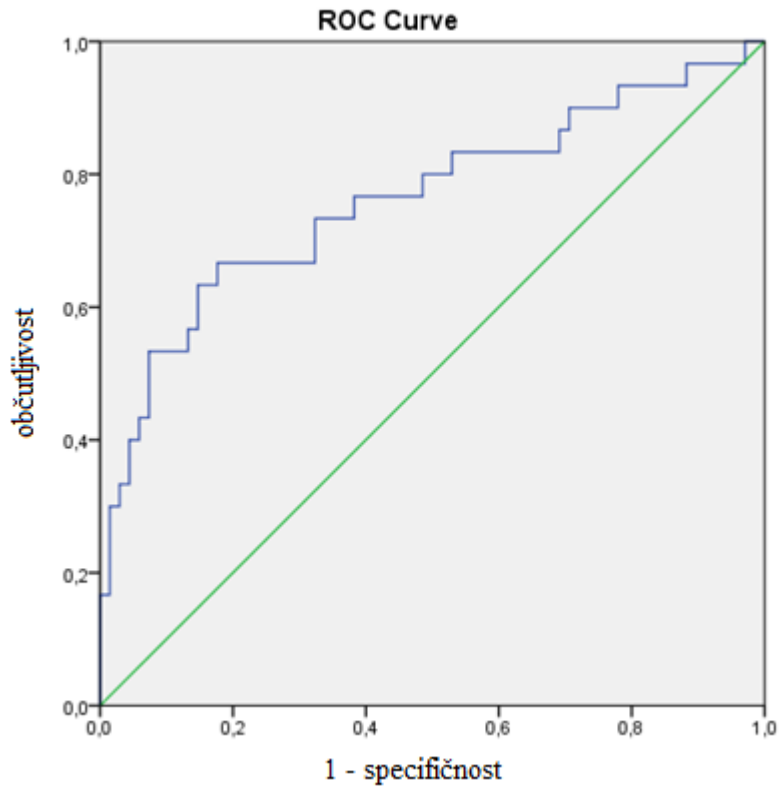
	%fPSA ~ %p2PSA	%fPSA ~ PHI	%fPSA ~ p2PSA
Razlika med krivuljama	0,119	0,097	0,016
95% CI	0,001 - 0,237	-0,01 - 0,21	-0,16 - 0,19
z statistika	1,97	1,72	0,18
Signifikanca	p = 0,048	p = 0,084	p = 0,856



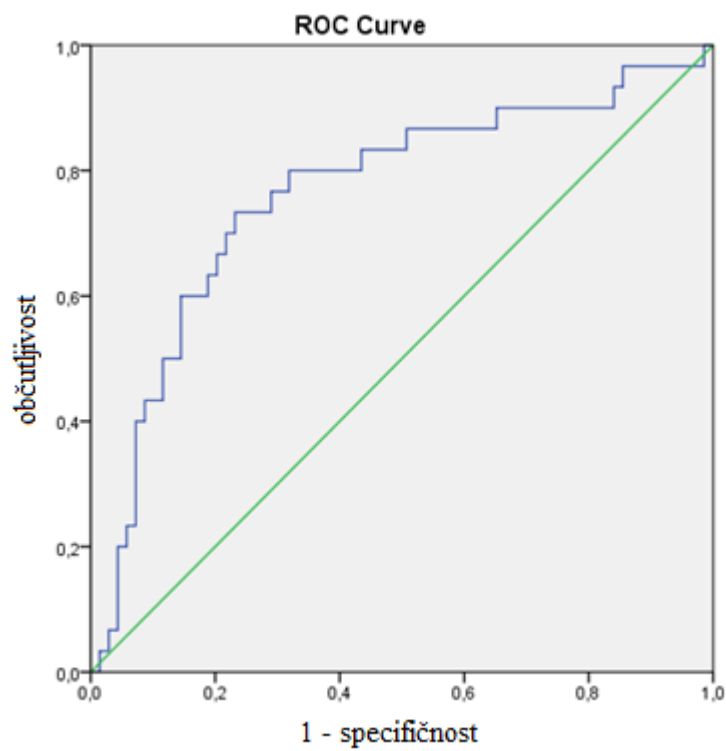
Graf 8: ROC krivulja za parameter tPSA



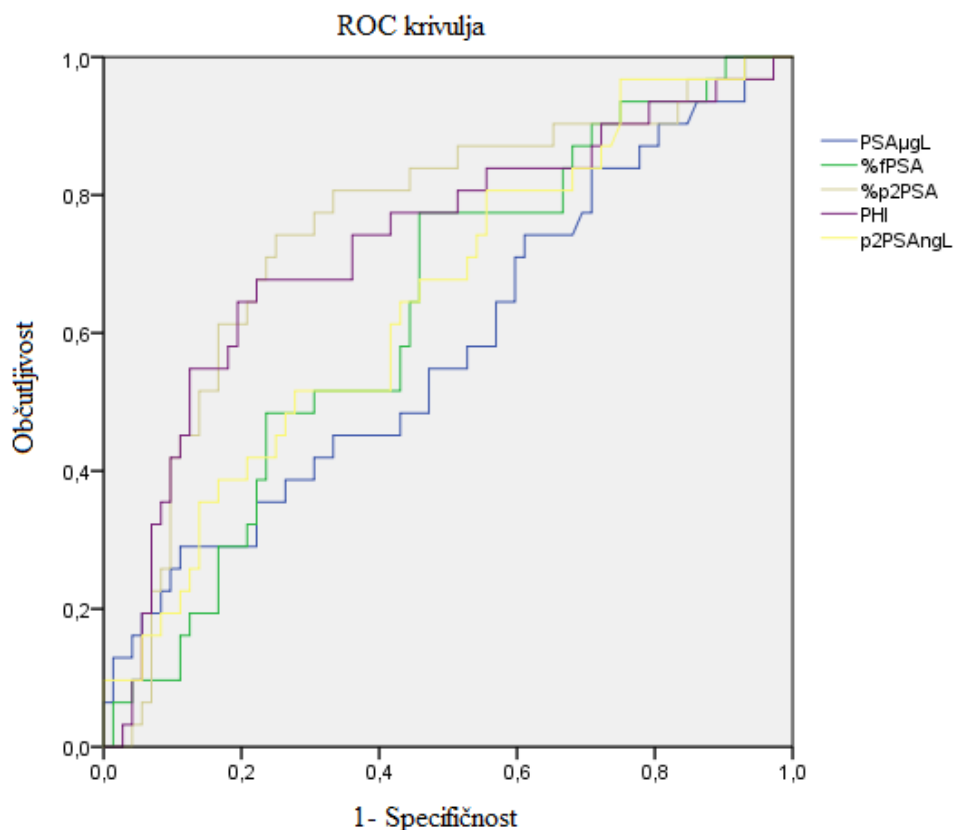
Graf 9: ROC krivulja za parameter %fPSA



Graf 10: ROC krivulja za parameter PHI.



Graf 11: ROC krivulja za parameter %p2PSA.

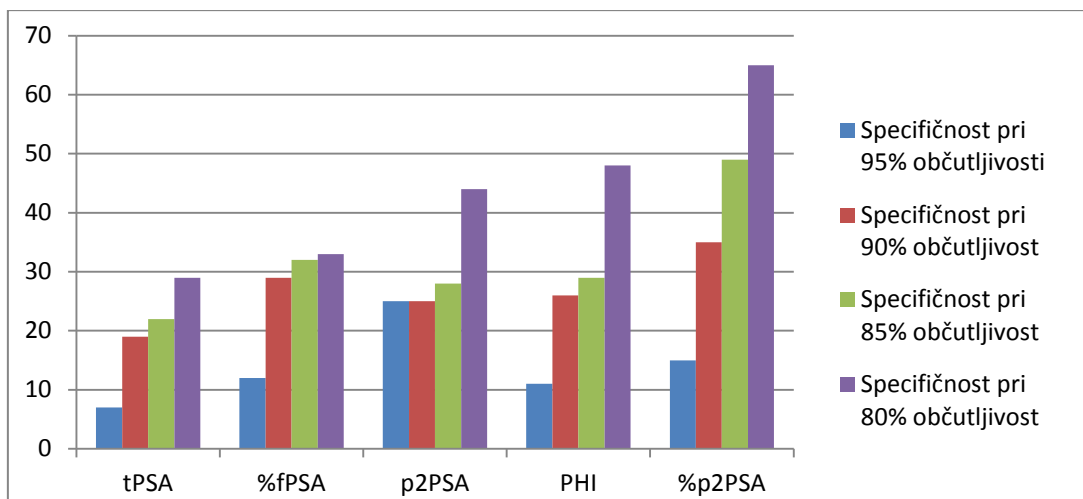


Graf 12: ROC krivulje za parametre tPSA, %fPSA, %p2PSA, PHI in p2PSA.

S pomočjo ROC krivulj smo lahko odčitali in primerjali različne vrednosti specifičnosti tumorskih markerjev v odnosu z občutljivostjo. Iz rezultatov ROC krivulj lahko razberemo, da je specifičnost za parametre PHI in %p2PSA znatno višja od parametrov %fPSA in tPSA pri 80-90 % občutljivosti. Pri občutljivosti višji od 90 %, pa ni več bistvenih razlik med specifičnostjo PHI, %p2PSA in %fPSA.

Preglednica XV: Specifičnost testov pri 95 %, 90 %, 85 % in 80 % občutljivosti.

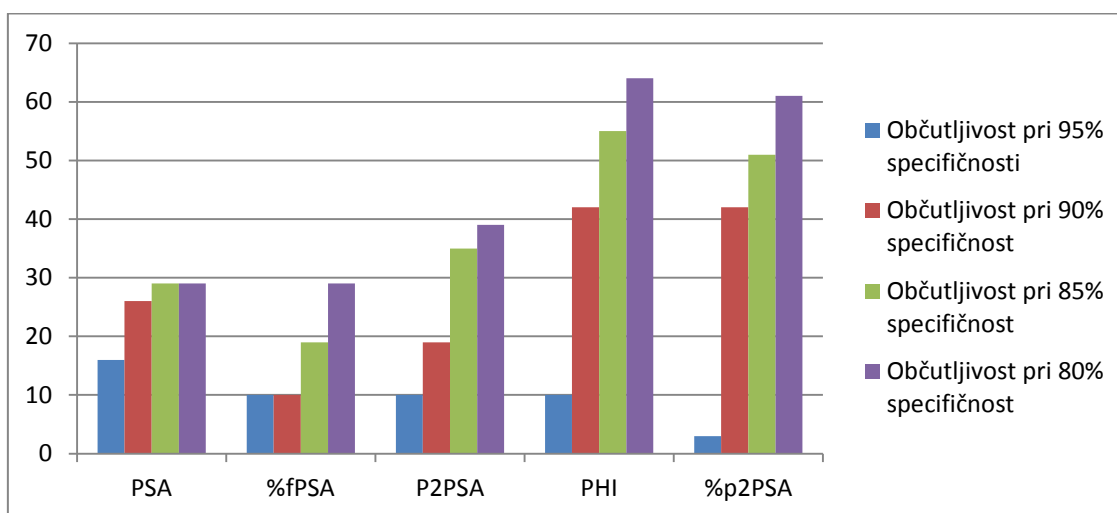
Občutljivost (%)	Specifičnost (%)				
	tPSA	%fPSA	p2PSA	%p2PSA	PHI
95	7	12	25	15	11
90	19	29	25	35	26
85	22	32	28	49	29
80	29	33	44	65	48



Graf 13: Prikaz specifičnosti pri različnih mejah občutljivosti testov.

Preglednica XVI: Občutljivost testov pri 95 %, 90 %, 85 % in 80 % specifičnosti.

Specifičnost (%)	Občutljivost (%)				
	PSA	%fPSA	P2PSA	%p2PSA	PHI
95	16	10	10	3	10
90	26	10	19	42	42
85	29	19	35	51	55
80	29	29	39	61	64



Graf 14: Prikaz občutljivosti pri različnih mejah specifičnosti.

Preglednica XVII: Kontingenčna tabela prikazuje število preiskovancev razvrščenih glede na rezultate biopsije ob upoštevanju 90 % občutljivosti testov.

	Resnično pozitivni	Resnično negativni	Lažno pozitivni	Lažno negativni
tPSA				
cut-off > 3,22 µg/L	28	13	59	3
%fPSA				
cut-off < 21,0%	28	21	51	3
PHI				
cut-off > 25,2	28	20	52	3
%p2PSA				
cut-off > 1,26 %	28	27	45	3
p2PSA				
cut-off > 8,00 ng/L	28	18	54	3

Legenda: cut-off je vrednost nad katero smo rezultate šteli za pozitivne pri 90% občutljivosti.

Preglednica XVIII: Delež lažno pozitivnih biopsij upoštevajoč, kot edino merilo za biopsijo, vrednosti tumorskih markerjev.

	Št. preiskovancev (n)	Pozitivna biopsija (n)	Negativna biopsija (n)	Lažno pozitivnih %
tPSA > 4,0µg/L	61	21	40	65 %
tPSA < 4,0 µg/L	42	11	31	
tPSA > 4,0µg/L, %fPSA < 25%	53	18	35	57%
tPSA > 4,0µg/L, %fPSA > 25%	8	2	6	
tPSA > 4,0µg/L, PHI > 26,9	44	16	28	46%
tPSA > 4,0µg/L, PHI < 26,9	15	4	11	
tPSA > 4,0µg/L, %p2PSA > 1,26%	43	18	25	41%
tPSA > 4,0µg/L, %p2PSA < 1,26%	18	3	15	

Legenda: lažno pozitivni % = št. negativnih biopsij / št. preiskovancev s tPSA > 4,0µg/L

4.7. INTERVALI PHI

V tuji literaturi so navedene tabele verjetnosti za prisotnost raka prostate, glede na različne intervalne vrednosti PHI (40). V ta namen smo v magistrski nalogi primerjali, naše podatke z že znanimi.

Preglednica XIX: Verjetnost za PCa pri različnih intervalih PHI in koncentraciji tPSA od 2,0 do 10,0 µg/L iz literature (40).

PHI interval	< 26,9	27,0 – 35,9	36,0 – 54,9	>55
Verjetnost PCa (%)	9,8	16,8	33,3	50,1
95 % interval zaupanja	5,2 - 15,5	11,3 - 22,2	26,8 - 39,9	39,8 - 61,0
Relativno povečanje tveganje za PCa	1,0	1,7	3,4	5,1

Preglednica XX: Izračun verjetnosti relativnega tveganja za PCa pri različnih intervalih PHI iz naše študije.

PHI intervali	< 26,9	27,0 – 35,9	36,0 – 54,9	>55
Verjetnost PCa (%)	16	15,4	32,2	63,6
Relativno povečanje tveganje za PCa	1,0	1,0	2,0	3,9

Preglednica XXI: Razmerje obetov za PCa pri različnih intervalih PHI.

PHI intervali	Pozitivni	Negativni	Razmerje obetov	95% CI
< 26,9	4	21	0,44	0,16 - 1,18
27,0 - 35,9	4	22	0,42	0,15 - 1,12
36,0 - 54,9	10	21	1,10	0,59 - 2,06
> 55,0	13	8	3,77	1,74 - 8,18

4.8. IZRAČUN OPTIMALNE REFERENČNE VREDNOSTI (CUT-OFF)

Za izračun optimalne referenčne vrednosti »cut-off« posameznega TO smo uporabili MedCalc program s katerim smo izračunali Youden index (J) (enačna 4). Maksimalni Youden index nam pove optimalno referenčno vrednost »cut-off« pri najboljšem razmerju občutljivost in specifičnost testa, ki se izračuna iz ROC krivulje.

Enačba 4: $Youden\ index\ (J) = občutljivost + specifičnost - 1$

Preglednica XXII: Izračun maksimalnega Youden indeksa in optimalne referenčne vrednosti "cut-off" za posamezne parametre.

	Youden index J	Optimalni »cut-off«	Občutljivost %	Specifičnost %
tPSA (µg/L)	0,18	> 6,38	29,0	88,9
%fPSA (%)	0,32	< 16,0	77,4	54,2
p2PSA (ng/L)	0,25	> 9,41	80,6	44,4
%p2PSA (%)	0,49	> 1,87	74,2	75,0
PHI	0,45	> 40,4	67,7	77,8

4.9. KORELACIJA ALI MOČ POVEZAVE MED SPREMENLJIVKAMI

Moč povezave oz. korelacijo med spremenljivkami smo testirali s pomočjo MedCalc programa. Izračunali smo Spearmanov koeficient korelacije (nenormalna porazdelitev podatkov). Statistično signifikantno povezavo pri dvostranski stopnji tveganja $\alpha < 0,05$.

Preglednica XXIII: Rezultati koeficientov korelacije po Spearmanu.

		tPSA	%fPSA	p2PSA	%p2PSA	PHI	Leto rojstva
tPSA	Koef. korel.		-0,305	0,338	-0,077	0,240	-0,328
	Sig. (p)		0,0018	0,0005	0,4386	0,0146	0,0007
%fPSA	Koef. korel.	-0,305		0,192	-0,406	-0,509	-0,138
	Sig. (p)	0,001		0,0521	<0,0001	<0,0001	0,1651
p2PSA	Koef. korel.	0,338	0,192		0,539	0,580	-0,399
	Sig. (p)	0,0005	0,0521		<0,0001	<0,0001	<0,0001
%p2PSA	Koef. korel.	-0,077	-0,406	0,539		0,858	-0,076
	Sig. (p)	0,438	<0,0001	<0,0001		<0,0001	0,4448
PHI	Koef. korel.	0,240	-0,509	0,580	0,858		-0,243
	Sig. (p)	0,0146	<0,0001	<0,0001	<0,0001		0,0133
Leto Rojstva	Koef. korel.	-0,328	-0,138	-0,399	-0,076	-0,243	
	Sig. (p)	0,0007	0,1651	<0,0001	0,4448	0,0133	

5. RAZPRAVA

Ker se večina rezultatov porazdeljuje nenormalno smo za testiranje primerjave povprečij dveh neodvisnih vzorcev uporabili Wilcoxon-ov test vsote rangov oz. Mann-Whitney U test. Iz preglednice VII (Mann-Witney test) razberemo signifikanco $p > 0,05$ pri tPSA, zato privzamemo ničelno hipotezo, da razlike v povprečni vrednostih tPSA med skupino bolnikov s PCa in skupino z drugimi ne-malignimi spremembami prostate ni statistično značilna oz. je nesignifikantna. Pri ostalih parametrih p2PSA ($p = 0,017$), %p2PSA ($< 0,0001$), %fPSA ($p = 0,035$) in PHI ($p < 0,001$) je signifikanca $p < 0,05$, zato lahko sprejmemo alternativno hipotezo in sklepamo, da so razlike v povprečnih vrednostih statistično značilne. Povprečne vrednosti parametrov p2PSA, %p2PSA, PHI so značilno višje v skupini bolnikov z dokazanim PCa. Povprečna vrednost parametra %fPSA, pa je statistično nižja v skupini bolnikov s PCa v primerjavi s skupino z benigno spremembo prostate. Pri vseh parametrih smo dobili pričakovane rezultate, ki so bili razvidni že iz preglednice IV.

Iz podatkov kontrolne skupine (preglednica XXVI) smo izračunali zgornje meje referenčnih intervalov. Za izračun smo uporabili MedCalc programa in t.i. »Robust metode«, ki jo uporabljamo ko imamo manj kot 120 vzorcev. Izračunali smo naslednje zgornje meje referenčnih intervalov: za %fPSA (7,87 %), p2PSA (19,81 ng/L), p2PSA (3,04 %) in PHI (63,80). Zgornji referenčni interval nam določa mejno vrednost za pozitiven rezultat. To so vrednosti, na podlagi katerih smo se odločili ali je test pozitiven ali negativen za PCa.

S pomočjo zgornje meje referenčnih intervalov smo izračunali občutljivost in specifičnost testov. Za izračun in primerjavo diagnostičnih vrednosti smo uporabili 2 X 2 kontingenčno tabelo. Iz preglednice XII lahko razberemo diagnostične vrednosti posameznih tumorskih označevalcev. Najvišjo diagnostično občutljivost smo izračunali za PHI 32,2 %, sledi parameter %p2PSA 22,6 %, p2PSA 19,3 %, najnižjo pa pri %fPSA 9,7 %. Občutljivost bi lahko povečali tako, da bi znižali mejno vrednost, vendar bi s tem znižali tudi specifičnost in posledično bi dobili večje število lažno pozitivnih rezultatov. Vrednosti za diagnostično specifičnost so znašale: za parameter %fPSA 94,4 %, %p2PSA 93,0 %, PHI 93,0 % in parameter p2PSA 91,7 %. Najvišjo napovedno vrednost pozitivnega testa ima PHI, ki znaša 66,7 %, najnižjo pa parameter %fPSA 42,8 %. Napovedna vrednost negativnega

testa je tudi najvišja pri PHI 77,0 %. Izračunano najbolj učinkovit testa je PHI 74,7 %, medtem ko je za ostale parametre izračunana učinkovitost nekoliko nižja za parameter %p2PSA je 71,8 %, p2PSA 69,9% in za parameter %fPSA 68,9%. Z zelo občutljivim testom bomo z večjo verjetnostjo ovrgli bolezen, če bo test negativen. Z zelo specifičnim testom bomo lahko z večjo verjetnostjo potrdili bolezen, če bo test pozitiven.

S pomočjo SPSS programa smo izvedli ROC analizo in izračunali površino pod ROC krivuljo AUC. Vrednosti AUC nam povedo verjetnost, da bo določen test pravilno ločil pozitivne od negativnih. Iz preglednice XIII razberemo, da ima največjo AUC parameter %p2PSA (**0,751**; $p < 0,0001$), malo nižjo PHI (**0,729**; $p < 0,0001$), p2PSA (**0,648**; $p = 0,017$), %fPSA (**0,632**; $p = 0,035$), ter najnižjo AUC ima tPSA (**0,580**; $p = 0,198$). To pomeni, da test tPSA pri koncentracijah v t.i. sivi coni med 2,0 do 10,0 $\mu\text{g/L}$ ni uporaben za ločevanje med zdravimi in bolnimi za rakom prostate. Parameter p2PSA se kot samostojni tumorski označevalec ne uporablja, saj ga je mednarodna organizacija FDA odobrila samo za izračun PHI in %p2PSA pri preiskovancih z nizko koncentracijo tPSA (2,0-10,0 $\mu\text{g/L}$) in nesumljivim DRP. S pomočjo programa MedCalc smo dokazali statistično signifikantno razliko AUC samo med %fPSA ~ %p2PSA ($p = 0,048$). Pri primerjavi razlike med AUC %fPSA ~ PHI smo imeli malenkost manjšo razliko in signifikanco ($p = 0,084$). Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da sta nova tumorska označevalca %p2PSA in PHI boljša od parametra %fPSA za ločevanje zdravih od obolelih za rakom prostate, pri preiskovancih z nizko koncentracijo tPSA (2,0-10,0 $\mu\text{g/L}$).

Eno izmed vprašanj, na katero smo želeli odgovoriti, je bilo ali bi se lahko izognili določenim številom nepotrebnih biopsij prostate s pomočjo novih tumorskih označevalcev. Primerjali smo število nepotrebnih biopsij, če bi upoštevali 90 % občutljivosti TO kot merilo o odločitvi ali se preiskovance testira z biopsijo prostate ali ne. Število nepotrebnih biopsij je enako številu lažno pozitivnih rezultatov. Iz preglednic XVII je razvidno, da je število vseh nepotrebnih biopsij ob upoštevanju parametra %fPSA (pri 90 % občutljivosti) 51. S pomočjo parametra %p2PSA bi lahko v našem primeru zmanjšali število nepotrebnih biopsij za 11 % (pri 90 % občutljivosti testa). Če pa bi upoštevali PHI (pri 90 % občutljivosti) razlike napram %fPSA nismo zaznali.

Iz preglednice XVIII lahko razberemo število negativnih biopsij, če smo upoštevali kot merilo za biopsijo samo vrednosti TO. Pri upoštevanju, kot merilo za biopsijo samo vrednost parametra tPSA $> 4,0 \mu\text{g/L}$, bi imeli 65 % negativnih biopsij, ob tem bi zgrešili 11 primerov PCa. Ko dodamo tPSA-ju še vrednost %fPSA $< 25 \%$, kot merilo za biopsijo, bi imeli 57 % negativnih biopsij, ob tem bi zgrešili 2 primera PCa. Pri upoštevanju tPSA $> 4,0 \mu\text{g/L}$ skupaj s PHI $> 26,9$, bi imeli 46 % negativnih biopsij. Ter če upoštevamo tPSA $> 4,0 \mu\text{g/L}$ skupaj s %p2PSA $> 1,26 \%$, pa bi imeli 41 % negativnih biopsij, ob tem bi zgrešil 3 primere PCa. S praktično enakim učinkom, bi lahko z uporabo merila (tPSA $> 4,0 \mu\text{g/L}$ in %p2PSA $> 1,26 \%$) za odločitev o postopku biopsije znižali število nepotrebnih biopsij za 16 % v primerjavi z merilom (tPSA $> 4,0 \mu\text{g/L}$ in %fPSA $< 25 \%$).

Za boljšo oceno občutljivost in specifičnosti testov, bi morali zbrati večje število vzorcev krvi bolnikov z rakom prostate. Težava je lahko tudi ta, da v naši raziskovalni nalogi zaradi majhnega števila pozitivnih bolnikov z rakom prostate, nismo upoštevali izvidov DRP, saj kot sem že opisal se novi parameter p2PSA priporoča za izračun %p2PSA in PHI pri moških, ki imajo tPSA med 2,0 do 10,0 $\mu\text{g/L}$ in **nesumljiv** DRP prostate.

Izračunali smo verjetnost relativnega tveganja, da imajo preiskovanci prisoten rak prostate pri različnih intervalih PHI, ter ju primerjali z priporočili proizvajalca reagentov (40). Kot razberemo iz preglednic XIX in XX se izračuni relativnega tveganje in verjetnosti PCa, kljub majhnemu številu vzorcev v naši študiji, zelo dobro ujemajo s podatki iz literature (40). Preiskovanci s PHI > 55 so imeli 64 % verjetnost, da so zboleli za PCa, napram tistim s PHI $< 26,9$, ki so imeli samo 16 % verjetnost PCa. Relativno tveganje za PCa pri skupini moških s PHI > 55 je 3,9- krat višje kot pri skupini, ki je imela PHI $< 26,9$.

Z MedCalc programom smo izračunali maksimalni Youden indeks za optimalno referenčno vrednost t.i. cut-off. Iz preglednice XXII razberemo, da ima parameter %p2PSA najvišji Youden indeks 0,49 to pomeni najboljše razmerje občutljivosti 74% in specifičnosti 75%. Parameter %fPSA, ki se sedaj uporablja pri diagnostiki PCa ima pri optimalni cut-off ($< 16,0 \%$) občutljivost 77 % ter specifičnost 54 %, kar je približno 20 % nižja specifičnosti napram testu %p2PSA. Izračunane optimalne cut-off vrednosti s pomočjo Youden indeksa so za parametre: p2PSA ($> 9,41 \text{ ng/L}$), %p2PSA ($> 1,87 \%$) in PHI ($> 40,37$).

Testirali smo tudi moč povezave oz. korelacijo med testi po Spearmanu (preglednica XXIII). Korelacijski koeficienti med spremenljivkami so vsi zelo nizki, razen med parametroma %p2PSA in PHI ($r = 0.85$, $p < 0,001$), kar je pričakovano saj se oba izračunavata iz istih podatkov. Pomembne je izpostaviti, da med letnico rojstva in parametri p2PSA ($r = -0,399$, $p < 0,0001$), %p2PSA ($r = -0,076$, $p = 0,445$) in PHI ($r = -0,243$, $p = 0,013$) nismo dokazali dobre korelacije. To pomeni, da so novi testi uporabni za celotno proučevano starostno obdobje. Podobne rezultate o moči povezave smo dobili tudi za podatke med letnico rojstva in parametrom tPSA ($r = -0,328$, $p = 0,0007$) in %fPSA ($r = -0,138$, $p = 0,165$).

6. SKLEP

Namen naše magistrske naloge je bil, da ocenimo klinično uporabnost določanja prekursorja prostatno specifičnega antigena p2PSA pri bolnikih z nizko koncentracijo tPSA. Na osnovi rezultatov lahko postavimo naslednje sklepe:

- Parametri p2PSA, tPSA in fPSA morajo biti izmerjeni na istem aparatu z enakim standardom kalibratorja (WHO ali Hybritech).
- V skupini moških, ki so imeli diagnosticiran rak prostate in koncentracijo tPSA v t.i. sivi coni med 2,0 do 10,0 $\mu\text{g/L}$ je bila mediana za parametre p2PSA, %p2PSA, PHI značilno višja, za parameter %fPSA, pa značilno nižja v primerjavi s skupino moških z negativno biopsijo.
- Visoke vrednost AUC ($p < 0,05$) za parametra %p2PSA in PHI je dokaz, da tumorska označevalca bolje ločujeta zdrave preiskovance od obolelih za rakom prostate, kot tumorska označevalca tPSA in %fPSA.
- Dokazali smo, da je vrednost AUC za parameter %p2PSA statistično višja od parametra %fPSA ($p = 0,048$).
- Parameter p2PSA ima statistično ne-signifikantno razliko AUC ($p > 0,05$) v primerjavi s parametrom %fPSA, zato se ga kot posamezni test ne priporoča za ločevanje preiskovancev med zdravim in bolnimi, ampak samo v kombinaciji s parametroma tPSA in fPSA za izračun %p2PSA in PHI.
- Specifičnost parametrov %p2PSA in PHI so višje od tPSA in %fPSA pri 80 - 90 % občutljivosti.
- Pri izračunu optimalne referenčne vrednosti »cut-off« je imel parameter %p2PSA najboljše razmerje med občutljivostjo in specifičnostjo.
- Ob upoštevanju mejne vrednosti »cut-off« parametra %p2PSA pri 90 % občutljivosti, bi lahko zmanjšali število nepotrebnih biopsij za 11 % v primerjavi s parametrom %fPSA pri enaki občutljivosti. Vendar bi pri taki občutljivosti testov lahko spregledali 10 % bolnikov z rakom prostate.
- Pomanjkljivost magistrske naloge je bilo relativno majhno število vzorcev krvi bolnikov z rakom prostate. Z večjim številom vzorcev bi lahko bolje ocenili občutljivost in specifičnost novih testov. Pri uvajanju testa v klinično prakso bo potrebno izvesti še dodatne večje validacijske študije, z upoštevanjem rezultatov DRP in stadija raka prostate.

7. LITERATURA

1. Lee H C, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A: Overview of Prostate Anatomy, Histology and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2011; 40: 565-575.
2. Angelo M. De Marzo, Elizabeth A. Platz, Siobhan Sutcliffe, Jianfeng Xu, Henrik Grönberg, Charles G. Drake, Yasutomo Nakai, William B. Isaacs & William G. Nelson: Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* April 2007; 7: 256-269.
3. Alkiviades K, Gregorakis, Dimitrios Malovrouvas, Stefanos Stefanakis, Konstantina Petraki, Andreas Scorilas: Free/Total PSA (F/T ration) kinetics in patients with clinically localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Clinica Chimica Acta* 2005; 357: 198-201.
4. Bren A, Kocjančič A, Mrevlje F: Bakteriške okužbe sečil, *Interna medicina, DZS Ljubljana*, 2000: 759-760.
5. Tršinar B: Rezultati zdravljenja benigne prostatične obstrukcije s finasteridom. *Zdravstveni vestn* 2001; 70: 733-6.
6. Židanik S: Obravnava bolnikov z benigno hiperplazijo prostate BHP pri zdravnikih splošne medicine, *Zdrav vestn* 2003; 72: 411-5
7. Rak v Sloveniji 2008. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2011.
8. Mašera A, Ovčak Z: Patohistološka diagnostika karcinoma prostate, Urološka sekcija SZD in Urološka klinika, Klinični center Ljubljana na 1. Slovenskem urološkem simpoziju, maj 1995.
9. Tanja Č, Kmetec A, Kragelj B, Oblak C, Sedmak B: Smernice za zdravljenje raka prostate. *Združenje urologov Slovenije* 2008: 7-11.
10. Djavan B: Screening for prostate cancer practical analysis of the ERSPC and PLCO trials. *Eur Urol* 2011 Mar; 59: 365-9.
11. Long JA, Daanen V, Moreau-Gaudry A, Troccaz J, Rambeaud JJ, Descotes JL: Prostate biopsies guided by three-dimensional real-time (4-D) transrectal ultrasonography on a phantom comparative study versus two-dimensional transrectal ultrasound-guided biopsies. *Eur Urol.* 2007 Oct; 52(4): 1097-104.

12. Walz J, Graefen M, Chun FK, Erbersdobler A, Haese A, Steuber T, Schlomm T, Huland H, Karakiewicz PI: High incidence of prostate cancer detected by saturation biopsy after previous negative biopsy series. *Eur Urol*. 2006 Sep; 50(3): 498-505.
13. Sedmak B: Pomen prostatičnega specifičnega antigena (PSA) pri diagnostiki raka prostate. *Zdrav vestn* 1997; 66: 473-6.
14. Joško Osredkar, Janja Marc: Laboratorijska medicina I : učbenik za študente medicine, farmacije in laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 16-27.
15. Homan G, Oblak C: Pomen PSA pri bolnikih z rakom na prostati, Urološka sekcija SZD in Urološka klinika, Klinični center Ljubljana na 1. Slovenskem urološkem simpoziju, maj 1995.
16. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E: Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987; 317: 909-16.
17. Kert S, Tušek-Bunc K: Kako prepoznati bolnika z BHP v ambulanti zdravnika družinske medicine, 6. Mariborski kongres družinske medicine, Združenje zdravnikov družinske medicine, Ljubljana, 2010; 6: 1-7.
18. Yousef GM, Diamandis EP: The new human tissue kallikrein gene family Structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001; 22: 184-204.
19. Lovgren J, Valtonen-Andre C, Marsal K, et al: Measurement of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in different body fluids. *J Androl* 1999; 20: 348-355.
20. European Association of Urology 2015: Guidelines on Prostate Cancer. http://uroweb.org/wp-content/uploads/09-Prostate-Cancer_LR.pdf (dostop 01.03.2016)
21. Lalić N, Aćimović M, Majkić Singh N, Mičić S: Uloga prostatičnog specifičnog antigena u rano diagnozi karcinoma prostate. *Jugoslov Med Biohem* 2003; 22: 283-8.
22. Klomp MLF, Hendrikx AJM, Keyzer. The effect of transrectal ultrasonography (TRUS) including digital rectal examination (DRE) of the prostate on the level of prostate specific antigen (PSA). *Br J Urol* 1994; 73: 71-4.
23. Oblak C: Prostatični specifični antigen, *Onkologija za prakso*, leto X / št1, junij 2006.
24. Zisman A, Soffer Y, Siegel YI, Paz A, Linder A: Post ejaculation serum prostate specific antigen level. *Eur Urol* 1997; 32: 54-7.

25. Herchman JD, Smith DS, Catalona WJ: Effect of ejaculatin on serum total and free prostate specific antigen contentration. *Urology* 1997; 50: 239-43.
26. Guess HA,Heyse JF, Gormley GJ, Stoner E, Oesterling OE: Effect of finasteride on serum PSA concentration in men with benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am* 1998; 20: 627-36.
27. Semjonow A, Köpke T, Eltze E, Pepping-Schefers B, Bürgel H, Darte C: Pre-analytical in-vitro stability of [-2]proPSA in blood and serum. *Clin Biochem.* 2010 Jul; 43: 926-8.
28. Joško Osredkar: Vloga PSA v odkrivanju raka prostate, Urološka sekcija Zdravniškega Društva 8. slovenski urološki simpozij 2000.
29. 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 May 27; 350(22): 2239-46.
30. PSA and Other Biomarkers for Early Detection, Diagnosis and Monitoring of Prostate Cancer – 2005 <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol16no2/160206200510.htm>
31. Oblak C.: Zgodnje odkrivanje, zdravljenje in spremljanje bolnikov z rakom prostate. *Radiologi and Oncology* 2006; 40: 127-136.
32. Žumer-Pregelj M, Sedmak B: Transrektalni ultrazvočni pregled prostate in ultrazvočno vodena biopsija, Urološka sekcija Zdravniškega Društva in Urološka klinika UKC Ljubljana na 1. slovenskem urološkem simpoziju, maj 1995.
33. 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 multicentre clinical trial. *JAMA* 1998 May 20; 279(19): 1542-7.
34. Mikolajczyk SD, Marker KM, Millar LS, et al: A truncated precursor form of prostate-specific antigen is a more specific serum marker of prostate cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 695-8.
35. Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse HG, Marks LS, Song W, et al: A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Res* 2000; 60: 756-9.
36. Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ, Amirkhan A, et al: Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml. *J Urol* 2003; 170: 2181-5.

37. Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, et al: Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clin Chem.* 2004; 50: 1017.
38. Sokoll LJ, Wang Y, Feng Z, Kagan J, Partin AW, Sanda MG, et al: [-2]proenzyme prostate specific antigen for prostate cancer detection: a national cancer institute early detection research network validation study. *J Urol* 2008; 180: 539-43.
39. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, Slawin KM, Marks LS, Loeb S, Broyles DL, Shin SS, Cruz AB, Chan DW, Sokoll LJ, Roberts WL, van Schaik RH, Mizrahi IA. 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: 1650–5.
40. Draft Directional insert Access Immunoassay Systems Hybritech p2PSA: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf9/P090026c.pdf (dostop 30.01.2016)
41. Igor Locatelli: Urejanje in prikazovanjepodatkov I: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/em%C5%A1fFarmaceutvska_informatika/Locatelli_I.-Prikazovanje_podatkov.pdf (dostop 20.03.2016)
42. MedCalc easy to use statistical software:
<https://www.medcalc.org/manual/referenceinterval.php> (dostop 20.03. 2016)
43. Mitja Košnik, Franc Mrevlje, Dušan Štajer, Peter Černelč, Mirta Koželj: *Interna medicina, Littera Picta d.o.o, Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 1664-65.*
44. Zhu Wen, Zeng Nancy, Wang Ning: Sensitivity, Specificity, Accuracy, Associated Confidence Interval and ROC Analysis with Practical SAS® Implementations, Inc, Fort Washington, PA 20Octagon Research Solutions, Wayne, PA 1. INTRUDUCTION
Diagnosis tests include different kinds of information, such as medical tests
<http://www.cpdm.ufpr.br/documentos/ROC.pdf> (Dostop 8. 10. 2015)
45. The Nacional Academy of Clinical Biochemistry NACB: Practice guidelines and recommendations for use of tumor marcercs in the clinic, Volume 15: 2002; 20-25.
46. Heidenreich A1, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, Mason M, Matveev V, Wiegel T, Zattoni F, Mottet N: EAU guidelines on prostate cancer screening, diagnosis and local treatment with curative intent. *Eur Urol.* 2014 Jan; 65(1): 124-37.

8. PRILOGA

Preglednica XXIV: Vrednosti parametrov 1. skupine, kjer biopsija ni potrdila PCa.

Zapor. šte.	Letnica rojstva	tPSA (µg/L)	fPSA (µg/L)	p2PSA (ng/L)	PHI	Volumen prostate (mL)	%fPSA	PSAD	%p2PSA
1	1952	2,27	0,77	19,79	38,80	60,0	0,34	0,04	2,57
2	1948	2,36	0,55	10,50	29,34	25,3	0,23	0,09	1,90
3	1950	2,37	0,44	8,21	28,61	35,0	0,19	0,07	1,86
4	1949	2,51	0,57	8,78	24,43	27,7	0,23	0,09	1,54
5	1958	2,64	0,43	8,62	32,56	29,6	0,16	0,09	2,00
6	1946	2,83	0,48	3,22	11,19	36,0	0,17	0,08	0,67
7	1949	2,84	0,64	12,53	32,78	34,1	0,23	0,08	1,96
8	1957	2,86	0,43	7,17	28,34	51,0	0,15	0,06	1,67
9	1957	2,86	0,31	8,99	49,33	35,0	0,11	0,08	2,90
10	1941	2,95	0,81	15,02	31,86	51,0	0,27	0,06	1,85
11	1948	3,12	0,40	4,69	20,47	57,0	0,13	0,05	1,17
12	1940	3,20	0,43	9,61	40,27	30,0	0,13	0,11	2,23
13	1969	3,22	0,57	9,95	31,50	71,0	0,18	0,05	1,75
14	1948	3,24	0,60	7,00	20,82	39,0	0,19	0,08	1,17
15	1950	3,38	1,03	8,11	38,91	35,0	0,30	0,10	0,78
16	1952	3,40	0,67	4,01	11,07	61,8	0,20	0,06	0,59
17	1942	3,45	1,00	11,06	20,52	60,5	0,29	0,06	1,11
18	1945	3,45	0,78	14,52	34,59	70,0	0,23	0,05	1,86
19	1941	3,47	0,73	3,94	10,09	97,7	0,21	0,04	0,54
20	1953	3,47	0,69	8,72	23,62	33,0	0,20	0,11	1,26
21	1944	3,50	0,38	21,25	105,07	36,1	0,11	0,10	5,59
22	1950	3,59	0,60	8,78	27,63	33,7	0,17	0,11	1,46
23	1951	3,60	0,52	3,07	11,13	52,0	0,14	0,07	0,59
24	1937	3,68	0,96	15,72	31,54	67,0	0,26	0,05	1,64
25	1942	3,74	0,70	7,67	21,33	51,2	0,19	0,07	1,09
26	1946	3,75	0,86	12,64	28,57	29,6	0,23	0,13	1,47
27	1955	3,75	0,25	6,19	48,40	20,0	0,07	0,19	2,47
28	1950	3,80	0,66	10,23	30,31	54,0	0,17	0,07	1,55
29	1949	3,86	0,62	12,80	40,37	40,0	0,16	0,10	2,06
30	1949	3,92	0,65	13,63	41,23	39,4	0,17	0,10	2,09
31	1948	3,95	0,36	8,53	46,86	25,4	0,09	0,16	2,37
32	1958	4,09	0,48	0,74	3,12	47,0	0,12	0,09	0,15

33	1948	4,10	0,59	10,52	36,07	37,0	0,14	0,11	1,78
34	1952	4,17	0,62	18,76	62,04	30,0	0,15	0,14	3,02
35	1950	4,22	3,05	9,07	37,52	41,0	0,72	0,10	0,29
36	1947	4,30	0,63	8,96	29,35	28,9	0,15	0,15	1,42
37	1947	4,32	0,56	6,77	25,28	29,6	0,13	0,15	1,21
38	1949	4,35	0,56	9,33	34,50	29,5	0,13	0,15	1,67
39	1959	4,41	0,72	27,35	79,22	24,1	0,16	0,18	3,80
40	1953	4,42	0,41	1,66	59,72	23,0	0,09	0,19	0,40
41	1948	4,62	0,34	10,77	68,05	50,0	0,07	0,09	3,17
42	1941	4,67	1,14	19,51	37,04	85,0	0,24	0,05	1,71
43	1931	4,69	1,38	12,51	19,57	31,0	0,29	0,15	0,91
44	1947	4,79	0,24	9,41	87,05	20,6	0,05	0,23	3,92
45	1958	4,81	0,93	10,30	24,33	27,1	0,19	0,18	1,11
46	1951	4,85	0,49	12,23	55,25	29,0	0,10	0,17	2,49
47	1938	4,90	1,11	17,47	34,76	46,0	0,23	0,11	1,57
48	1948	4,91	1,07	13,97	28,94	49,0	0,22	0,10	1,30
49	1951	4,99	1,27	10,72	18,78	67,5	0,25	0,07	0,84
50	1960	5,00	1,08	5,78	11,96	63,0	0,22	0,08	0,53
51	1940	5,17	0,51	7,61	34,18	27,5	0,10	0,19	1,49
52	1946	5,30	0,96	3,65	8,73	37,0	0,18	0,14	0,38
53	1952	5,31	0,78	10,25	30,41	25,0	0,15	0,21	1,31
54	1949	5,40	0,61	12,73	48,20	55,1	0,11	0,10	2,08
55	1942	5,53	1,68	28,61	40,07	50,0	0,30	0,11	1,70
56	1959	5,55	0,82	13,30	38,18	37,0	0,15	0,15	1,62
57	1949	5,71	0,53	8,84	39,92	12,3	0,09	0,46	1,67
58	1939	5,77	1,57	24,74	37,82	73,0	0,27	0,08	1,57
59	1949	5,78	1,03	15,14	35,20	51,0	0,18	0,11	1,47
60	1952	5,92	2,17	21,14	23,77	58,1	0,37	0,10	0,97
61	1939	6,13	1,07	14,11	32,80	49,1	0,17	0,12	1,32
62	1949	6,20	0,61	4,47	18,26	46,0	0,10	0,13	0,73
63	1941	6,22	0,87	13,21	37,82	48,7	0,14	0,13	1,52
64	1943	6,38	1,04	11,95	28,94	36,0	0,16	0,18	1,15
65	1948	6,67	0,88	8,79	25,83	60,7	0,13	0,11	1,00
66	1946	6,97	0,53	7,31	36,67	24,0	0,08	0,29	1,40
67	1941	7,27	1,13	12,42	29,65	77,0	0,16	0,09	1,10
68	1953	7,40	1,16	6,72	15,70	47,0	0,16	0,16	0,58
69	1950	7,46	0,96	15,98	45,34	35,6	0,13	0,21	1,66

70	1942	7,82	0,69	28,32	115,00	17,0	0,09	0,46	4,10
71	1957	8,01	0,86	15,95	52,36	60,0	0,11	0,13	1,85
72	1954	8,81	0,88	12,23	41,18	51,1	0,10	0,17	1,39

Preglednica XXV: Vrednosti parametrov 2. skupine, kjer biopsija je potrdila PCa.

Zap. šte.	letnica rojstva	tPSA (µg/L)	fPSA (µg/L)	p2PSA (ng/L)	PHI	Volumen prostate (mL)	%fPSA	PSAD	%p2PSA
1	1954	2,66	0,26	8,24	51,40	27,6	0,10	0,10	3,17
2	1938	2,68	0,51	10,88	34,87	25,0	0,19	0,11	2,13
3	1943	3,12	0,63	11,25	32,42	52,0	0,20	0,06	1,79
4	1949	3,34	0,53	7,98	27,46	65,0	0,16	0,05	1,51
5	1936	3,44	0,42	10,68	46,83	27,7	0,12	0,12	2,54
6	1943	3,51	0,67	15,93	44,60	28,5	0,19	0,12	2,38
7	1958	3,52	0,26	8,00	58,31	21,3	0,07	0,17	3,07
8	1956	3,60	0,56	11,12	37,38	83,0	0,16	0,04	1,98
9	1943	3,84	0,84	13,24	30,88	52,0	0,22	0,07	1,57
10	1954	3,87	0,41	16,00	77,04	45,0	0,11	0,09	3,90
11	1951	3,90	0,52	9,79	37,51	40,0	0,13	0,10	1,88
12	1959	4,03	0,63	8,11	25,73	32,0	0,16	0,13	1,28
13	1965	4,05	0,47	9,48	40,86	23,9	0,12	0,17	2,02
14	1951	4,18	0,44	9,45	44,12	12,0	0,11	0,35	2,15
15	1942	4,37	0,70	21,92	65,49	24,0	0,16	0,18	3,13
16	1949	4,39	0,70	20,28	60,44	45,0	0,16	0,10	2,89
17	1946	4,64	0,47	11,16	51,44	35,0	0,10	0,13	2,37
18	1962	4,95	1,36	10,15	16,58	55,8	0,27	0,09	0,75
19	1945	5,10	0,61	18,34	67,38	31,0	0,12	0,16	3,00
20	1945	5,35	0,82	23,63	66,59	34,0	0,15	0,16	2,88
21	1954	5,57	0,53	16,13	71,58	26,2	0,10	0,21	3,04
22	1953	5,67	1,10	31,35	68,10	56,0	0,19	0,10	2,85
23	1950	6,46	0,74	19,50	66,86	18,3	0,11	0,35	2,63
24	1950	6,96	1,82	14,89	21,64	56,0	0,26	0,12	0,82
25	1958	7,20	0,71	13,90	52,68	22,0	0,10	0,33	1,96
26	1942	7,43	0,40	8,76	59,57	48,5	0,05	0,15	2,19
27	1946	7,65	0,43	13,37	85,38	23,9	0,06	0,32	3,11
28	1954	8,06	1,25	35,28	80,13	30,0	0,16	0,27	2,82
29	1935	8,66	0,96	16,45	50,15	77,4	0,11	0,11	1,71
30	1946	9,84	1,22	3,85	9,85	43,5	0,12	0,23	0,32

31	1944	9,99	1,5	49,45	98,28	19,3	0,16	0,52	3,11
----	------	------	-----	-------	-------	------	------	------	------

Preglednica XXVI: Podatki kontrolne skupine za izračun referenčnih intervalov.

Zap. številka.	tPSA $\mu\text{g/L}$	fPSA $\mu\text{g/L}$	p2PSA ng/L	PHI	Volumen prostate TRUZ (mL)	PSAD	%fPSA	%p2PSA
1	1,18	0,240	4,58	20,46	29,4	0,04	20,34	1,91
2	1,21	0,250	6,29	27,47	60,0	0,02	20,66	2,52
3	1,55	0,410	7,22	22,17	49,3	0,03	26,45	1,76
4	1,66	0,170	5,81	43,61	18,4	0,09	10,24	3,42
5	1,71	0,450	10,01	29,00	36,5	0,05	26,32	2,22
6	2,27	0,770	19,79	38,80	60,0	0,04	33,92	2,57
7	2,36	0,550	10,50	29,34	25,3	0,09	23,31	1,91
8	2,37	0,440	8,21	28,61	35,0	0,07	18,57	1,87
9	2,51	0,570	8,78	24,43	27,7	0,09	22,71	1,54
10	2,64	0,430	8,62	32,56	29,6	0,09	16,29	2,00
11	2,83	0,483	3,22	11,19	36,0	0,08	17,07	0,67
12	2,84	0,640	12,53	32,78	34,1	0,08	22,54	1,96
13	2,86	0,430	7,17	28,34	51,0	0,06	15,03	1,67
14	2,86	0,310	8,99	49,33	35,0	0,08	10,84	2,90
15	2,95	0,810	15,02	31,86	51,0	0,06	27,46	1,85
16	3,12	0,400	4,69	20,47	57,0	0,05	12,82	1,17
17	3,20	0,430	9,61	40,27	30,0	0,11	13,44	2,23
18	3,22	0,570	9,95	31,50	71,0	0,05	17,70	1,75
19	3,24	0,600	7,00	20,82	39,0	0,08	18,52	1,17
20	3,38	1,030	8,11	38,91	35,0	0,10	30,47	0,79
21	3,40	0,670	4,01	11,07	61,8	0,06	19,71	0,60
22	3,45	1,000	11,06	20,52	60,5	0,06	28,99	1,11
23	3,45	0,780	14,52	34,59	70,0	0,05	22,61	1,86
24	3,47	0,730	3,94	10,09	97,7	0,04	21,04	0,54
25	3,47	0,690	8,72	23,62	33,0	0,11	19,88	1,26
26	3,50	0,380	21,25	105,07	36,1	0,10	10,86	5,59
27	3,59	0,600	8,78	27,63	33,7	0,11	16,71	1,46
28	3,60	0,520	3,07	11,13	52,0	0,07	14,44	0,59
29	3,68	0,960	15,72	31,54	67,0	0,05	26,09	1,64
30	3,74	0,700	7,67	21,33	51,2	0,07	18,72	1,10
31	3,75	0,860	12,64	28,57	29,6	0,13	22,93	1,47
32	3,75	0,250	6,19	48,40	20,0	0,19	6,67	2,48
33	3,80	0,660	10,23	30,31	54,0	0,07	17,37	1,55
34	3,86	0,620	12,80	40,37	40,0	0,10	16,06	2,06
35	3,92	0,650	13,63	41,23	39,4	0,10	16,58	2,10
36	3,95	0,360	8,53	46,86	25,4	0,16	9,11	2,37

37	4,09	0,480	0,74	3,12	47,0	0,09	11,74	0,15
38	4,10	0,590	10,52	36,07	37,0	0,11	14,39	1,78
39	4,17	0,620	18,76	62,04	30,0	0,14	14,87	3,03
40	4,22	3,050	9,07	37,52	41,0	0,10	72,27	0,30
41	4,30	0,630	8,96	29,35	28,9	0,15	14,65	1,42
42	4,32	0,560	6,77	25,28	29,6	0,15	12,96	1,21
43	4,35	0,560	9,33	34,50	29,5	0,15	12,87	1,67
44	4,41	0,720	27,35	79,22	24,1	0,18	16,33	3,80
45	4,42	0,410	1,66	59,72	23,0	0,19	9,28	0,40
46	4,62	0,340	10,77	68,05	50,0	0,09	7,36	3,17
47	4,67	1,140	19,51	37,04	85,0	0,05	24,41	1,71
48	4,69	1,380	12,51	19,57	31,0	0,15	29,42	0,91
49	4,79	0,240	9,41	87,05	20,6	0,23	5,01	3,92
50	4,81	0,930	10,30	24,33	27,1	0,18	19,33	1,11
51	4,85	0,490	12,23	55,25	29,0	0,17	10,10	2,50
52	4,90	1,110	17,47	34,76	46,0	0,11	22,65	1,57
53	4,91	1,070	13,97	28,94	49,0	0,10	21,79	1,31
54	4,99	1,270	10,72	18,78	67,5	0,07	25,45	0,84
55	5,00	1,080	5,78	11,96	63,0	0,08	21,60	0,54
56	5,17	0,510	7,61	34,18	27,5	0,19	9,86	1,49
57	5,30	0,960	3,65	8,73	37,0	0,14	18,11	0,38
58	5,31	0,780	10,25	30,41	25,0	0,21	14,69	1,31
59	5,40	0,610	12,73	48,20	55,1	0,10	11,30	2,09
60	5,53	1,680	28,61	40,07	50,0	0,11	30,38	1,70
61	5,55	0,820	13,30	38,18	37,0	0,15	14,77	1,62
62	5,71	0,530	8,84	39,92	12,3	0,46	9,28	1,67
63	5,77	1,570	24,74	37,82	73,0	0,08	27,21	1,58
64	5,78	1,030	15,14	35,20	51,0	0,11	17,82	1,47
65	5,92	2,170	21,14	23,77	58,1	0,10	36,66	0,97
66	6,13	1,070	14,11	32,80	49,1	0,12	17,46	1,32
67	6,20	0,610	4,47	18,26	46,0	0,13	9,84	0,73
68	6,22	0,870	13,21	37,82	48,7	0,13	13,99	1,52
69	6,38	1,040	11,95	28,94	36,0	0,18	16,30	1,15
70	6,67	0,880	8,79	25,83	60,7	0,11	13,19	1,00
71	6,97	0,530	7,31	36,67	24,0	0,29	7,60	1,38
72	7,27	1,130	12,42	29,65	77,0	0,09	15,54	1,10
73	7,40	1,160	6,72	15,70	47,0	0,16	15,68	0,58
74	7,46	0,960	15,98	45,34	35,6	0,21	12,87	1,66
75	7,82	0,690	28,32	115,0	17,0	0,46	8,82	4,10
76	8,01	0,860	15,95	52,36	60,0	0,13	10,74	1,85
77	8,81	0,880	12,23	41,18	51,1	0,17	9,99	1,39
78	10,35	1,060	17,38	52,50	29,6	0,35	10,24	1,64
79	10,62	2,410	10,35	14,01	60,0	0,18	22,69	0,43

Praktične smernice NACB in EGTM pri klinični uporabi tumorskega markerja PSA.

- Za diagnozo raka prostate naj se ne uporablja tPSA marker sam, ampak skupaj z DRP prostate.
- Biopsijo prostate ne priporočajo pri preiskovancih z normalnim DRP in koncentracijo tPSA < 4 µg/L.
- NACB priporoča uporabo referenčne vrednosti tPSA za posamezne skupine glede na starost in raso. EGTM pa ta priporočila izključuje.
- Oboji priporočajo uporabo %fPSA, če je vrednost tPSA med 4-10 µg/L, ter pri negativnem DRP prostate.
- Priporoča se, da se odvzem krvi za meritev tPSA izvaja pred kakršno koli manipulacijo na prostati.
- V kolikor je izmerjena koncentracija tPSA povišana se priporoča ponovitev testa čez 2 do 4 tedne.
- Priporočila za rokovanje z vzorci:

Vzorci je potrebno v 3 urah po odvzemu krvi centrifugirati in serume shraniti pri + 4 °C. Vzorce se lahko hranijo 24 ur pri + 4°C. Vzorce, ki se ne analizirajo v 24 urah je potrebno zamrzniti pri -20°C ali nižji temperaturi, za daljše hranjenje vzorcev je potrebno zamrzniti pri -70°C ali nižji temperaturi.

- Uporabnike je potrebno informirati:
 - a) O nazivu testa.
 - b) O analitični občutljivosti testa.
 - c) O veljavnem referenčnem območju, ki je navedeno v uporabi testa.
 - d) Upoštevati je potrebno etnične in regionalne razlike v referenčni populaciji.
 - e) Rezultate tPSA je potrebno interpretirati skupaj z DRP.
- V laboratoriju je potrebno določiti, katera je najnižja merljiva koncentracija. Upoštevati je potrebno vpliv intraindividualne biološke variacije in o tem obvestiti klinično osebje ter vpeljati kontrolo kakovosti (45).

Priporočila evropskega združenja urologov pri uporabi PSA za presejanje in diagnozo raka prostate.

- Masovnega presejanja za PCa ne priporočajo, vseeno zgodnja diagnoza PCa pri posameznikih temelji na DRP in meritvi tPSA. Karcinom prostate se potrdi s histopatološko analizo vzorca prostate. Biopsijo prostate priporočajo pri bolnikih s sumljivim DRP skupaj s povišano ali normalno koncentracijo tPSA.
- PSA označevalec je organsko specifičen, ter nespecifičen za diagnostiko raka prostate, saj je pogosto povišan pri drugih benignih spremembah prostate.
- Pri koncentraciji tPSA med 4-10 $\mu\text{g/L}$ in normalnem DRP priporočajo meritev prostega PSA za izračun %fPSA za lažjo odločitev o morebitni biopsiji. Ugotovljeno je bilo, da moških s %fPSA < 10% imajo 56 % verjetnost, da imajo rak prostate. Skupina, ki je imela %fPSA > 25 %, pa je imela verjetnost prisotnosti raka prostate samo 8 %. Pri uporabi %fPSA moramo biti pazljivi, saj lahko predanalitični dejavniki vplivajo na rezultate (nestabilnost fPSA pri sobni temperaturi in 4⁰C).
- Različne modifikacije koncentracije PSA lahko izboljšajo specifičnost pri zgodnji diagnostiki raka prostate npr. PSAD, gostota PSA prehodne cone, PSAV, podvojena koncentracija PSA in uporaba referenčnih vrednosti glede na starost. Vendar so novejša raziskava pokazale, da nekatere od teh metod ne izboljšajo napovedne vrednosti meritve tPSA, zato se ne priporoča uporaba v klinični praksi.
- PHI je novejši diagnostični krvni test, ki naj bi zmanjšal število nepotrebnih biopsij predvsem pri moških s koncentracijo tPSA med 2,0 in 10,0 $\mu\text{g/L}$ (46).