

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

Visokošolski strokovni program
Laboratorijske biomedicine

VERICA LEDERER

**UVEDBA DOLOČANJA PROSTATNO SPECIFIČNEGA ANTIGENA V
SERUMU Z ELEKTROLUMINISCENČNO IMUNOKEMIJSKO METODO**

INTRODUCTION OF PROSTATIC SPECIFIC ANTIGEN DETERMINATION
IN SERA BY ELECTROLUMINESCENCE IMMUNOASSAY METHOD

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravila v laboratoriju za klinično biokemijo in hematologijo v Bolnišnici Golnik – KOPA, pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom doc. dr. Pike Meško Brguljan.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Borutu Božiču za strokovno pomoč in vodenje pri izdelavi diplomske naloge. Somentorici doc. dr. Piki Meško Brguljan za pomoč pri izvedbi praktičnega dela. Predsenici diplomske komisije izr. prof. dr. Janji Marc in članici diplomske komisije doc. dr. Barbari Ostanek se tudi zahvaljujem za koristne nasvete pri oblikovanju moje naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem zaposlenim v laboratoriju za klinično biokemijo in hematologijo Bolnišnice Golnik – KOPA.

Posebna zahvala gre moji družini, ki mi je ves čas stala ob strani in me podpirala pri študiju in nastanku diplome.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Borutom Božičem in somentorstvom doc. dr. Pike Meško Brguljan.

Verica Lederer

Podpis:

Ljubljana, november 2009

Predsenica diplomske komisije: izr. prof. dr. Janja Marc

Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek

KAZALO

POVZETEK

SEZNAM OKRAJŠAV

1 UVOD	1
1.1. ANATOMSKE ZNAČILNOSTI PROSTATE	1
1.1.1. Razdelitev prostate po Mc Nealu	1
1.2. BOLEZENSKA STANJA PROSTATE	2
1.2.1. Atrofija	2
1.2.2. Prostatitis	2
1.2.3. Benigna hiperplazija prostate (BHP)	2
1.2.4. Rak prostate	3
1.3. DIAGNOSTIKA RAKA PROSTATE	4
1.4. TUMORSKI OZNAČEVALCI PROSTATE IN UPORABA	5
1.5. PSA	6
1.5.1. Zgodovina PSA	6
1.5.2. Biokemijske značilnosti in molekulske oblike PSA	6
1.5.3. Regulacija izločanja PSA	7
1.5.4. Biološka funkcija PSA	8
1.5.5. PSA v serumu in drugih tkivih	8
1.5.6. Endogeni vplivi na koncentracijo PSA	9
1.5.7. Diagnostični pomen PSA	9
1.5.8. Pomen določanja fPSA in cPSA	11
1.6. PRAKTIČNE SMERNICE IN PRIPOROČILA ZA UPORABO TUMORSKIH OZNAČEVALCEV V KLINIČNI PRAKSI	12
1.6.1. Priporočila NACB in EGTM za klinično uporabo PSA pri karcinomu prostate	12
1.7. METODE ZA DOLOČANJE PSA V SERUMU	13
1.8. PRINCIP DOLOČANJA PSA	14
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. VZORCI	16
3.2. METODA ZA DOLOČANJE CELOTNEGA PSA (tPSA)	16
3.2.1. Funkcionalna zaporedja sistema	16
3.3. OPREMA IN REAGENTI ZA DOLOČANJE tPSA	18
3.4. STATISTIČNE METODE	22
3.5. VERIFIKACIJA METODE	23
3.5.1. Natančnost metode	23
3.5.2. Točnost metode	24
3.5.3. Linearnost metode	24
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.2. TOČNOST METODE – pravilnost, z metodo dodatka (recovery test)	35
4.3. TEST LINEARNOSTI	37
5. SKLEP	41
6. PRILOGA REZULTATI	42
7. LITERATURA	45

POVZETEK

Prostatno specifični protein (PSA) sintetizirajo epitelijske celice prostate ter parauretralne žleze pri moških. V kri se izloča sekundarno in je reaktivni označevalec. PSA je tkivno in ne tumorsko specifični označevalec. Klinične raziskave potrjujejo uporabnost PSA pri ugotavljanju raka prostate. Povišana vrednost PSA poda sum na prisotnost raka prostate in zahteva dodatne diagnostične postopke.

Namen diplomskega dela je uvedba določanja PSA v serumu z elektroluminiscenčno imunokemijsko metodo. Izvedli smo verifikacijo analizne metode.

PSA smo določali na imunokemijskem analizatorju ELECSYS 2010, proizvajalca Roche Diagnostics. Metoda za določanje PSA v serumu ali plazmi sloni na načelu reakcije antigena in protitelesa. Uporabili smo test, ki je primeren za analite z veliko molekulsko maso in temelji na sendvič principu.

Natančnost metode smo dokazali z ugotavljanjem statistično značilnih razlik za šestdeset vzorcev med posameznimi dnevi. Za nenormalno porazdeljene rezultate meritev smo uporabili neparametrični Wilcoxonov test predznačenih rangov. Koeficient zanesljivosti med dnevi je 0,995. Zanimalo nas je, ali je skladnost rezultatov v seriji enaka znotraj istega dne in tudi med dnevi. Postavili smo ničelno hipotezo (H_0) in to predpostavko testirali z enosmerno analizo variance. Ugotovili smo homogenost varianc z Levenovim testom, ki se je pokazal statistično neznačilen ($p > 0,05$). V vseh treh dneh je F preizkus 0, kar potrjuje skladnost naših rezultatov. Analiza pokaže, da ne obstajajo statistično značilne razlike med ponovitvami po dnevih – ANOVA: $p > 0,05$. Cronbachova alfa za skladnost ponovitev med rezultati istega vzorca po dnevih pri ugotavljanju ponovljivosti v seriji znaša 0,995. Točnost metode smo testirali s testom razmerja obojestranskih (Likelihood ratio). Ugotovili smo, da se izmerjene vrednosti statistično neznačilno razlikujejo od pričakovanih vrednosti, če izmerjenemu vzorcu dodajamo znano koncentracijo PSA. S testom linearnosti smo dokazali, da je izbrana analizna metoda zmožna v določenem območju dajati rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije iskanega analita v vzorcu. Izračuni so pokazali, da je pri vseh treh vzorcih koeficient korelacije $r > 0,999$, kar kaže na zelo močno linearno povezanost spremenljivk.

Elektroluminiscenčna imunokemijska metoda se je pokazala za primerno za določanje PSA v serumu. Z verifikacijo metode smo ugotovili njeno zanesljivost, točnost in zmožnost v določenem območju dajati rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije PSA v vzorcu.

SEZNAM OKRAJŠAV:

Ab	protitelo
ACS	Ameriško onkološko združenje
ACT	α_1 -antikimotripsin
A2M	α_2 -makroglobulin
BHP	benigna hiperplazija prostate
BP	vezalni protein (binding protein)
c-PSA	vezani prostatno specifični antigen
f-PSA	prosti prostatno specifični antigen
t-PSA	celotni prostatno specifični antigen
PSA	prostatno specifični antigen
PSA-ACT	prostatno specifični antigen v kompleksu z α_1 -antikimotripsinom
DRP	digitalni rektalni pregled
IGF	rastni faktor
IGFBP	na proteine vezani insulinu-podobni rastni faktorji
hK2, hK3	humani kalikreini
KLK1	tkivni kalikrein
KLK2	žlezni kalikrein
LNCaP	celična linija raka prostate
TRUZ	transrektalni ultrazvok
NACB	Nacionalna akademija za klinično biokemijo
EGTM	Evropska skupina za tumorske označevalce
IQC	interna kontrola kakovosti
EQA	zunanja ocena kakovosti
DHT	dihidrotestosteron
PSAD	gostota PSA (PSA density)
ECLIA	elektrokemiluminiscenčna imunokemijska metoda
ECL	elektrokemiluminiscenca
TPA	fosfatni pufer tripropilamin
PSA CAL1	PSA kalibrator 1
PSA CAL2	PSA kalibrator 2
PC TM1	kontrola kakovosti -tumorski označevalec 1
PC TM2	kontrola kakovosti -tumorski označevalec 2

1 UVOD

1.1. ANATOMSKE ZNAČILNOSTI PROSTATE

Prostata je žleza okrogle oblike velikosti kostanja (1). Je vezivno-mišična žleza, ki obdaja moško sečnico in leži pod sečnim mehurjem. Ejakulatorna brizgalnika se izlivata v sečnico (2). Po izvodilih se izliva v sečnico tudi belkast lepljiv alkalen izloček, specifičnega vonja. Alkalnost izcedka nevtralizira kislo reakcijo v sečnici in nudi semenčicam ugodne pogoje za gibanje (1,2).

Prostata je zgrajena iz vezivnega tkiva, gladkih mišičnih niti in žlez (3). Prostato sestavlja 30 do 50 alveolotubularnih drobnih žlez, razporejenih radialno okoli sečnice (1,4). V sečnico se izliva tudi izloček dveh žlez v velikosti graha: bulbouretralni žlezi, ki sta tik ob brecilu in Cowperjevi žlezi, ki se nahajata za brecilom, v katerem se izgublja sečnica. Izcedek teh žlez primerno ovlaži sluznico sečnice pred izbrizganjem semena (4). Predprostatični sfinkter obdaja proksimalni del sečnice in sega od vratu sečnega mehurja do roba verumontanuma. Distalni gladkomišični in prečnoprogasti mišični sfinkter se nahajata okoli distalnega dela sečnice. Na ta način se v žlezi združijo urinske in semenske poti. Prostata tako leži med obema mišicama, ki skrbita za kontinenco seča pri moškem. Žlezno tkivo zajema 66 %, vezivno mišična stroma pa 33 % celotne žleze (5).

1.1.1. Razdelitev prostate po Mc Nealu

Sodobne poglede na anatomijo in histologijo prostate je utemeljil McNeal, ki je razdelil prostato v tri osnovne žlezne cone in fibromuskularno stromo. Taka razdelitev prostate ima velik pomen pri anatomske opredelitvi najpogostejših patoloških dogajanj (5):

- Osrednji del, ki ima obliko stožca, leži okrog ejakulatornih vodov in ga sestavljajo velike žleze s papilarnimi poganjki.
- Periferni del, ki obdaja osrednji del zadaj, ob straneh in spodaj. Žleze so majhne, epitelij nizek, stroma razrahljana. Izvodila se odpirajo v distalni del sečnice.
- Prehodni del zajema 5 % celotne žleze. Žleze so podobne žlezam v perifernem delu, številno jih je manj, stroma pa je gostejša.
- Fibromuskularna stroma (5, 6).

1.2. BOLEZENSKA STANJA PROSTATE

1.2.1. Atrofija

Atrofija pogosto prizadene periferni del prostate, osrednji in prehodni del sta občasno prizadeta. Pri atrofični prostati vidimo majhne žlezne formacije okrog kolabiranega izvodila. Atrofične žleze so opete z enoplastnim epitelijem nizkih celic, z majhnimi hiperkromatičnimi jedri (5).

1.2.2. Prostatitis

Prostatitis ali vnetje prostate je lahko akutno ali kronično, bakterijsko ali nebakterijsko (2). Pri akutnem prostatitisu je značilen nepričakovan začetek bolezni s pojavom povišane telesne temperature, pojavljajo se disurija, hematurija in pogosta uriniranja. Tako vnetje povzroči povečano izločanje prostatno specifičnega antigena v serum (PSA), ki običajno traja šest tednov. Znižanje vrednosti PSA se doseže z zdravljenjem s sodobnimi antibiotiki, kar je klinično pomembno (2). Prostatitis pogosto prizadene periferni del prostate, osrednji in prehodni del sta občasno prizadeta (5). Povzročitelji akutnega prostatitisa so običajno po Gramu negativne bakterije ali *Staphylococcus aureus*, ki je Gram pozitivna bakterija (7).

Za diagnostiko kroničnega bakterijskega prostatitisa je potrebno izvesti nekaj zahtevnejših postopkov. Potreben je pregled seča, urinokultura, masaža prostate, pregled eksprimata prostate in kultura ejakulata. Z digitalno transrektalno masažo prostate dobimo prostatični sekret (ekspriat prostate) za mikrobiološki pregled, to povzroči večjo koncentracijo bakterij v seču in povečanje levkociturijske, kar ima diagnostični pomen (7).

Za nebakterijski prostatitis je značilna prisotnost znakov prostatitisa s številnimi levkociti v eksprimatu prostate, kultura seča pa je negativna. Pogosto se pojavlja pri mlajših moških, ki so imeli nespecifični uretritis. Povzročitelji so lahko *Chlamydia trachomatis* ali *Ureaplasma urealyticum* (7).

1.2.3. Benigna hiperplazija prostate (BHP)

BHP je dolgotrajna, napredujoča bolezen, za katero so značilni povečana prostata, obstrukcija pretoka seča in subjektivne težave z mokrenjem. Nezdravljenje privede do akutnega zastoja seča ali pa je potreben operacijski poseg, saj se lahko njen volumen

poveča v štirih letih za 14 % (8). BHP je nemaligno povečanje te žleze, za katero sta najpomembnejša dejavnika ogrožanja staranje in hormonsko neravnovesje (9).

Za rast in razvoj hiperplastične prostate in karcinoma prostate je odgovorna androgena stimulacija (5). Če nastopi BHP, se ta pogosto prične razvijati iz prehodne cone oziroma periuretralnih žlez. To je rastoči adenom, žleze se razraščajo in pritiskajo na centralno in periferno cono in jo počasi sploščujejo. Videz žleze je deformiran in pogosto prostata dviguje dno mehurja. Če je adenom velik, se ta dobro loči od zmanjšane prostornine centralne in periferne cone (6). V prizadevanju za vzajemno oskrbo tovrstnih bolnikov med urologi in zdravniki splošne medicine so nastale strokovne smernice, ki obsegajo:

- diagnozo motenj mokrenja
- indikacije za razpoznavo raka prostate
- farmakoterapijo
- indikacije za napotitev bolnikov z motnjami mokrenja k urologu (8).

1.2.4. Rak prostate

Rast incidence raka prostate lahko spremljamo v Sloveniji od leta 1950, ko se je pričela registracija raka v Sloveniji. Pri nobenem raku se incidenca s starostjo ne povečuje v taki meri kot pri raku prostate (10). Rak na prostati se pokaže v zunanjem delu žleze, ki je pod hormonskim vplivom androgenov (11).

Antiandrogeno zdravljenje ugodno vpliva na zmanjšanje primarnega tumorja ali zasevkov. Simptomi in znamenja se pokažejo najpogosteje zaradi prizadetosti sečil. Zaradi stiskanja spodnjih delov sečevodov lahko nastopi anurija (11). Karcinom prostate nima vzročne povezave z benigno hiperplazijo prostate, vendar večina karcinomov vznikne v hiperplastičnih žlezah (5).

Karcinom prostate se klinično pojavi v štirih oblikah:

- klinični
- incidentni
- latentni
- okultni

Klinični karcinom ugotovimo ponavadi z rektalno digitalno palpacijo, ki pokaže zatrditev in nepravilno oblikovanost prostate. Zvišanje koncentracije serumskega označevalca PSA, kot tudi pozitivna ultrazvočna preiskava kažejo na možnost kliničnega karcinoma.

Diagnoza mora biti vedno potrjena z histološkim pregledom bioptičnega tkiva (5).

Incidentni karcinom je odkrit naključno pri pregledu bioptičnega materiala, odvzetega pri sumu, da gre za karcinom. Najpogosteje najdemo incidentni karcinom v prostatah, ki so bile odstranjene zaradi nodularne hiperplazije. S histološkim pregledom se odkrije karcinom v 6–20 % takih prostat. Ta vrsta karcinoma leži v periuretralnem, prehodnem delu in je najpogosteje dobro diferenciran tumor (5).

Latentni karcinom prostate je tisti karcinom, ki se ga naključno odkrije pri avtopsiji in za bolnikovega življenja ni kazal nobenih simptomov. Navadno se ga najde v perifernem delu prostate in je dobro diferenciran. Iz neznanega vzroka nekateri dobro diferencirani karcinomi v perifernem delu metastazirajo, nekateri pa ostanejo latentni (5).

Okultni karcinom se najprej pokaže z metastazami v kosteh ali bezgavkah, primarni tumor pa je brez simptomov (5). Zato so lahko bolečine v kosteh ali revmatične težave prvi simptomi okultnega karcinoma (11). Za postavitev diagnoze določamo PSA v serumu. Tumorski označevalec dokazujemo tudi imunohistokemično v metastatskem tkivu. Pozitiven rezultat imunohistokemijske preiskave govori v prid prostatičnemu izvoru metastaze, negativen pa ga nikakor ne izključuje. Za končno postavitev diagnoze je potreben histološki pregled bioptičnega tkiva prostate (5).

1.3. DIAGNOSTIKA RAKA PROSTATE

Etiologija raka prostate še vedno ni poznana. Glavni dejavniki tveganja so starost, rasa in genetska predispozicija. Možni dejavniki so še hormonski status, spolna aktivnost, vpliv okolja in prehrana (12).

Zgodnje odkrivanje raka prostate je zelo pomembno, saj ga lahko ozdravimo le v začetnem stadiju. Pri diagnostiki te bolezni nam pomagajo temeljne preiskave: določanje koncentracije PSA, digitorektalni pregled (DRP), transrektalni ultrazvok (TRUZ), imunohistokemijske preiskave in histološki pregled bioptičnega tkiva prostate.

- Z uvedbo določanja koncentracije PSA v serumu se je zgodnja diagnostika raka prostate zelo spremenila. Z uporabo te preiskave odkrijemo vedno več raka prostate v zgodnjem stadiju, ko je bolezen še omejena na prostato. Določanje PSA uporabljamo kot presejalno metodo. Ameriško onkološko združenje –ACS priporoča enkrat letno merjenje PSA pri moških, starejših od 50 let in opustitev merjenja pri moških, starejših

od 75 let (12). PSA je najpomembnejši tumorski označevalec v vrednotenju raka na prostati. Povezan je skoraj izključno z boleznimi prostate, ni pa specifičen za raka. Vrednosti PSA so lahko zvišane tudi v drugih bolezenskih stanjih prostate, vključno z BHP ali prostatitisom. Nezmožnost, da s PSA določimo agresivnost tumorja, je resna omejitev PSA v zaznavanju raka na prostati. Približno 25 % moških z dokazanim rakom na prostati kaže normalno koncentracijo PSA, medtem ko ima kar 50 % moških z benignimi boleznimi prostate zvišano koncentracijo PSA (13).

- Patohistološka diagnostika raka prostate, histološki pregled biopsičnega tkiva prostate predstavlja zlati standard v diagnostiki karcinoma prostate, ki temelji na vrednotenju anaplazije jeder tumorskih celic, oceni invazijske rasti skozi bazalno membrano in spremembah zgradbe žleznega tkiva (14–16, 17). Za diagnozo karcinoma prostate moramo ugotoviti vsaj eno od teh treh značilnosti. Jedrna anaplazija je najpomembnejši in najzanesljivejši patohistološki znak te novotvorbe (5).

1.4. TUMORSKI OZNAČEVALCI RAKA PROSTATE IN UPORABA

Teoretično so možnosti za uporabo tumorskih označevalcev v onkologiji številne. Njihova dejanska uporabnost je odvisna od senzitivnosti in specifičnosti označevalca ter od zanesljivosti drugih metod, ki so na voljo za doseg istega cilja. Določanje tumorskih označevalcev za spremljanje dinamike maligne bolezni je danes uveljavljena in marsikdaj nenadomestljiva laboratorijska metoda v onkologiji. Njihova zanesljivost se izkaže pri spremljanju odgovora na zdravljenje ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve bolezni, preden se pojavijo klinični znaki bolezni (18). PSA je tumorski označevalec, ki je specifičen za prostato.

PSA se nahaja v:

- sekrecijskih celicah acinusov
- sekrecijskih celicah prostatičnih vodov
- sekrecijskih celicah prostatične uretre
- nevroendokrinih celicah (5)

PSA ni v :

- bazalnih celicah
- prehodnem epiteliju prostatičnih vodov in uretre

- semenskih veziklih in
- ejakulatornih vodih (5)

1.5. PSA

1.5.1. Zgodovina PSA

PSA je prvič odkril Hara s sodelavci v semenski tekočini leta 1971. Ta plazemski protein seminalne tekočine so označili kot γ -seminoprotein. Wang je leta 1979 iz tkiva prostate izoliral tkivno specifično snov, ki jo je poimenoval **prostatno specifični antigen** (19). Sintetizirajo ga epitelne celice duktusov in acinusov, kjer se tudi akumulira. Manjši del se izloča v semensko tekočino, kjer služi za njeno utekočinjenje. Izločanje v kri je sekundarno in posledica ne povsem poznanih mehanizmov. To dejstvo ga opredeljuje kot reaktivni označevalec, kar moremo upoštevati pri vrednotenju koncentracije tega antigena v serumu. Stamey je leta 1987 objavil rezultate prve klinične raziskave, ki je potrdila uporabnost PSA pri ugotavljanju raka na prostati (20, 21).

1.5.2. Biokemijske značilnosti in molekulske oblike PSA

PSA je glikoprotein iz skupine serinskih proteaz z molekulsko maso 35000. Sestavljen je iz preproste verige, ki vsebuje 237 aminokislin. Ima štiri stranske verige, ki jih tvorijo ogljikovi hidrati, povezani so preko aminokislin **asparagin-serin-treonin-serin** (19, 20). V serumu se PSA pojavlja v neaktivni prekurzorski obliki (M 30000-40000) ali vezan na proteazne inhibitorje (22).

PSA obstaja v najmanj petih izomernih oblikah z izoelektričnimi točkami med 6,8-7,5. Razlika med izomerami se pojavlja zaradi različne vsebnosti sialinske kisline. Glavni inhibitor je alfa-1-antikimotripsin (ACT). Manjše količine molekul PSA so vezane na inhibitorje alfa-1-proteinaze, alfa-2-makroglobulin in alfa-1-antitripsinski inhibitor. Majhne količine PSA so v prosti nevezani obliki (preglednica I) (23). Po tvorbi v tkivu prostate se izloča v semensko tekočino, kjer doseže izredno visoke koncentracije. V semenski tekočini razgradi specifične proteine na proteine manjših molekul kot so **seminogelin I in II in fibronektin**, ki sodelujejo v procesu utekočinjenja in seminalne koagulacije. To pomeni, da je aktivnost PSA podobna kimotripsinu in tripsinu. Avtorazgradnja PSA je mogoča na treh položajih in to **Lys 148, Lys 185 in Argi 85**. Da bi

se preprečilo avtorazgradnjo PSA v raztopinah se dodajajo inhibitorji proteaz (19, 22, 24). Molekula PSA vsebuje okoli 92 % peptidov in okoli 8 % ogljikovih hidratov (23).

Preglednica I: Molekulske oblike PSA v serumu (23)

Molekulska oblika	Molekulska masa	% od celotnega PSA
Prosti PSA	30 000	10 od 40
PSA alfa -1-antikimotripsin (PSA-ACT)	100 000	60 od 90
PSA alfa -1-proteinazni inhibitor	190 000	< 1
PSA alfa -2-makroglobulin	800 000	< 0,1
PSA alfa -1-antitripsinski inhibitor	250 000	< 0,1

Gen, ki določa PSA, je lokaliziran na kromosomu 19. Genski zapis je bil identificiran in kloniran v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (25). Podoben je genu za *kalikrein1* z 82 % identičnosti proteinske sekvence. PSA je poznan kot *humani kalikrein-hK3* vsebuje pet eksonov in štiri introne (19, 23). Kalikreini spadajo v skupino serinskih proteaz, od petnajstih imajo trije specifično biološko vlogo. Vsi so humani kalikreini *-hK*, podobne genetske strukture in se nahajajo v različnih tkivih: prostati, dojkah, ovarijih in testisih. Tako je *hK3* (PSA) visoko izražen v prostati, manj v dojkah, ščitnici, žlezah slinavkah in pljučih in sapniku. Tudi *hK2* se nahaja v epiteliju prostate in ima sposobnost, formiranja kompleksov z endogenimi antiproteazami. Uporablja se v imunohistokemiji za določanje stopnje karcinoma in metastaz limfnih vozlov (19).

1.5.3. Regulacija izločanja PSA

Tvorijo ga izključno epiteljske celice *acinusov in duktusov* prostate. Epitelij celic prostate ter parauretralnih žlez, tako benigne kot maligne, prispevajo merljivo količino PSA v serumu. Zato je PSA tkivno in ne tumorsko specifičen označevalec (26).

1 alfa, 25-dihidroksivitamin D3 (1,25-(OH)₂D3) je zelo pomemben zaviralec celične proliferacije in povečanega izločanja PSA iz celične linije raka prostate (LNCaP), ki so hormonsko odvisni. Sedanje študije so bile usmerjene v raziskave medsebojnega vpliva med 1,25-(OH)₂D3 in moškimi hormoni (androgeni) v regulaciji LNCaP celičnih funkcij. Rast LNCaP celic je inhibirana s 1,25-(OH)₂D3 (27).

1.5.4. Biološka funkcija PSA

PSA katalizira hidrolizo številnih proteinskih substratov. Deluje na substrate, kot so, vezoči protein za inzulinu podobni rastni faktor (insuline-like growth factor binding protein-3) (IGFBP-3). IGF je faktor rasti za različne celice (23). Družino inzulinu podobnih rastnih faktorjev sestavljata dve obliki rastnih faktorjev, IGF- in IGF-II. Po aminokislinski sestavi sta obe obliki zelo podobni proinzulinu. IGF-I in IGF-II se vežeta na IGF tip1 receptor (IGF1-R) s tirozin kinazno aktivnostjo in vplivata na celično proliferacijo, diferenciacijo in apoptozo, številnih tkiv. IGF-I povzroča hipertrofijo gladkih mišic v sečnem mehurju (28). V cirkulaciji IGF-I najdemo vezanega na vezalne proteine (binding protein-BP). Njihova vloga je transport IGF-I do mesta delovanja in podaljšanje življenjske dobe tako, da ga ščitijo pred vplivom proteoliznih encimov. Izolirali so šest genov, ki proizvajajo vezalne proteine z visoko afiniteto do IGF1. Proteine IGFBP kontrolirajo proteaze (29). Tako hidroliza IGFBP-3, nastala pod delovanjem PSA, lahko spremeni vrednosti IGF in na ta način preusmeri celično proliferacijo (23).

Poznana je vloga PSA v katalitični razgradnji zunajceličnih proteinov na manjše molekule, kot so fibronektin in laminin. Inhibicija proteolizne aktivnosti PSA s protitelesi za proteaze zmanjšuje invazijo na bazalno membrano celic karcinoma. Te ugotovitve dokazujejo, da ima PSA in njemu podobne proteaze pomembno vlogo v invaziji karcinoma in pojavu metastaz (23).

1.5.5. PSA v serumu in drugih tkivih

Ko PSA pride v krvni obtok, se veže in inaktivira s proteaznimi inhibitorji. Najpomembnejši inhibitorji so α_1 -antikimotripsin in α_2 -makroglobulin. Oba kompleksa sta zelo stabilna (30). PSA vezan za α_1 -antikimotripsin, je kompleksno vezani (PSA-ACT), ki ga je 70-90 % od celotnega PSA. Majhne količine PSA najdemo v prosti nevezani obliki. Od celotnega PSA je 10-30 % PSA v prosti obliki. PSA-ACT in prosti PSA označujemo kot celokupni PSA. PSA lahko najdemo v znojnih in parauretralnih žlezah, dojki, endometriju, v neprostatičnih tumorih kot so tumor dojke in žlezah slinavkah. Najden je v mleku in v amnijski tekočini (31, 32).

1.5.6. Endogeni vplivi na koncentracijo PSA

Koncentracije PSA v serumu se lahko spremenijo zaradi vpliva starosti, rase, sezonskih razlik. To moramo upoštevati pri spremljanju vrednosti PSA pri bolnikih. PSA vrednosti se spreminjajo s starostjo in se povečujejo med šesto in sedmo dekada življenja. Zaradi tega se v diagnostiki uporabljajo referenčne vrednosti, ki so korigirane s starostjo (31). Opazili so tudi razliko v vrednosti PSA pri različnih rasah. Ameriški Afričani imajo višje vrednosti od moških kavkazijske rase. Pri japonski populaciji so ugotovljene nižje vrednosti kot pri moških kavkazijske rase. Opazili so tudi sezonske variacije, ko se PSA poveča spomladi (31). Različni diagnostični postopki prav tako lahko vplivajo na spremembe v koncentraciji PSA. Na vrednosti PSA vplivajo manipulacije s prostato, kot je masaža prostate pri rektalnem pregledu, pri čem se vrednosti PSA lahko povečajo do dvakrat. Biopsija in druge kirurške intervencije na prostati lahko povečajo vrednost PSA do 60-krat glede na izhodno vrednost. Vpliv ejakulacije na povečanje vrednosti PSA je potrdilo več raziskav. Priporoča se spolna abstinenca pred določanjem vrednosti PSA, najmanj 24 ur (2, 33, 34). Na vrednosti PSA lahko vpliva tudi interakcija alfa-2-makroglobulina in PSA tako, da visoke koncentracije alfa-2-makroglobulina lahko zamaskirajo povišane vrednosti PSA, pojavijo se lažno znižane vrednosti PSA (31).

Na vrednosti PSA vplivajo tudi zdravila. Za zdravljenje BHP se uporablja zdravilo Finasterid, ki je zaviralec encima 5-alfa-reduktaze. S svojim delovanjem preprečuje pretvorbo testosterona v dihidrotestosteron (DHT), posledica česar je postopno zmanjševanje volumna prostate zaradi atrofije žleznega tkiva. Finasterid vpliva tudi na znižanje celotnega PSA v serumu, saj ga v večini primerov zniža v šestih mesecih za približno 50 % (15). Zato je pri zdravljenju BHP s finasteridom potrebno vrednosti celotnega PSA pomnožiti z dva, da dobimo njegovo realno vrednost (2, 8).

1.5.7. Diagnostični pomen PSA

PSA je specifičen za tkivo prostate in ne za sam karcinom prostate. Ima vodilno vlogo pri odkrivanju stadija karcinoma in za spremljanje uspešnosti terapije karcinoma prostate, v prognozi bolezni, pri oceni mase tumorja, pri zgodnjem odkrivanju recidiva in zgodnji diagnostiki karcinoma prostate. Pri BHP so vrednosti za PSA podobne kot pri zgodnjem stadiju raka prostate. Zvišane vrednosti dobimo tudi pri prostatitisu (19, 32). Slaba lastnost PSA je njegova nizka diagnostična specifičnost, posebej pri pacientih s koncentracijo

celotnega PSA (tPSA) v mejah »sive diagnostične cone«, kjer je razpon koncentracije tPSA od 4,00-10,00 µg/L. Odkritje, da se PSA pojavlja v več molekularnih oblikah, je prispevalo k boljši diferencialni diagnostiki karcinoma prostate. Z določanjem deleža prostega PSA (fPSA) se poveča specifičnost in občutljivost določanja tPSA v diferencialni diagnozi karcinoma prostate.

- Določanje fPSA v področju tPSA od 4,00-10,00 µg/L, povečuje diagnostično **specifičnost tPSA**, na ta način se izognemo nepotrebnim biopsijam prostate.

- Določanje fPSA v področju tPSA od 2,00-4,00 µg/L, povečuje diagnostično **občutljivost tPSA**, pomembno odkritje klinično pomembnih karcinomov (32). PSA ima visoko diagnostično občutljivost, vendar je njegova diagnostična specifičnost nizka. To povzroča številne nepotrebne biopsije pri bolnikih z zvišanimi vrednostmi PSA zaradi adenoma prostate. Da bi se povečala diagnostična specifičnost PSA, so se v diagnostiko uvedli določanje:

- gostota PSA (PSA density - PSAD)
- dinamika rasti PSA (PSA velocity)
- PSA referenčne vrednosti, odvisne od starosti
- testi za določanje fPSA
- testi za določanje cPSA (PSA-ACT) (31).

Gostota PSA - PSAD dobimo, če delimo vrednost PSA z volumnom prostate, določenim z ultrazvokom. Dejstvo je, da gram malignega tkiva sintetizira večjo količino PSA (3,5 µg/L/ml tkiva), kot adenom prostate (0,3 µg/L/ml tkiva). Obstaja tudi razlika v volumnu prostate pri omenjenih boleznih, tako so tudi vrednosti PSAD značilno večje pri karcinomu (0,47 µg/L/ml tkiva) glede na adenom prostate (0,10 µg/L/ml tkiva) (2, 31).

Če ima pacient vrednost PSA v »sivi coni« (4-10 µg/L) vendar z digitorektalnim pregledom (DRP) ni dokazan patološki izvid, vrednost PSAD je < 0,15 µg/L, takega pacienta se klinično spremlja. V krajših intervalih se spremljajo vrednosti PSA in rezultati digitorektalnega pregleda (2, 31).

Če so vrednosti PSAD > 0,15 µg/L, je pacientu potrebno izvesti biopsijo prostate za postavitev diagnoze karcinoma prostate (31).

Dinamika rasti PSA – vrednosti PSA se spremljajo skozi določeno obdobje. V času enega leta in pol je potrebno najmanj trikrat izvesti meritve za PSA. Če vrednosti za PSA rastejo več od 0,75 µg/L v enem letu, je to opozorilo za raka prostate (2).

PSA referenčne vrednosti korigirane glede na starost – Oesterling in sodelavci so pokazali, da se vrednosti PSA povečujejo z vsakim desetletjem življenja moških, ki niso imeli karcinoma. Ugotovili so, da se referenčne vrednosti 4 µg/L lahko uporabijo pri osebah v šesti dekadi življenja, pri starejših pa je te vrednosti potrebno korigirati. Dokazano je, da se vrednosti PSA spreminjajo s starostjo zaradi spremembe volumna prostate. Predlog je, da se zaradi izboljšanja diagnostične specifičnosti in diagnostične občutljivosti PSA, uporabljajo referenčne vrednosti v odvisnosti od starosti (preglednica II) (31).

Preglednica II: Referenčne vrednosti tPSA za starostno specifične skupine

Starostne skupine po letih	Referenčne vrednosti tPSA µg/L
40 – 49	0 – 2,5
50 – 59	0 – 3,5
60 – 69	0 – 4,5
70 – 79	0 – 6,5

Z znižanjem zgornje meje normalne vrednosti je omogočeno pogostejše odkrivanje karcinoma prostate pri mlajših moških (19, 32).

1.5.8. Pomen določanja fPSA in cPSA

Dokazano je, da maligne celice poleg povečanega izločanja PSA povečano izločajo tudi ACT, kateri se veže na PSA in v PSA-ACT obliki prihaja v cirkulacijo. Celice BHP nimajo optimalnih pogojev za tvorbo kompleksa PSA-ACT, tako se večja količina fPSA najde v cirkulaciji. Več študij je pokazalo, da določanje cPSA predstavlja napredek v odkrivanju karcinoma glede na določanje fPSA in razmerja fPSA/tPSA (35, 36). Drugi avtorji so v svojih raziskavah prišli do sklepa da so cPSA in razmerje cPSA/tPSA manj specifični v razmerju na fPSA in razmerje fPSA/tPSA (37, 38).

1.6. PRAKTIČNE SMERNICE IN PRIPOROČILA ZA UPORABO TUMORSKIH OZNAČEVALCEV V KLINIČNI PRAKSI

Na osnovi vseh dosedanjih dejstev so nastale praktične smernice, ki jih je izdala Nacionalna akademija za klinično biokemijo (NACB) v ZDA in Evropska skupina za tumorske označevalce (EGTM). Podale so pregled soglasja priporočil o uporabi tumorskih označevalcev. Priporočila se nanašajo na kakovost dobljenih rezultatov in kontrolo teh rezultatov. Kakovost končnega rezultata merjenja tumorskega označevalca je odraz vseh dogodkov nastalih v predpreiskovalnih, preiskovalnih in popreiskovalnih postopkih. Glavna odgovornost laboratorija je, da priskrbi točen rezultat in pravočasno priskrbi klinikom razpoložljive informacije, pomembne za specifičen test. Zadovoljiva meritev analita zahteva kakovosten vzorec, ki se analizira z metodo, za katero so definirane zahteve za notranjo (IQC, Internal Quality Control) in zunanjo kontrolo kakovosti (EQA, External Quality Assessment). Laboratorij se mora zavedati analitičnih motenj za določen parameter, ki vplivajo na točnost rezultata tumorskega označevalca. Zelo pomembne so popreiskovalne zahteve za uporabo tumorskih označevalcev, kot so klinične informacije zdravnika o stanju preiskovanca (po DRP, po operaciji, po kemoterapiji) in zahteve, ki se nanašajo na poročanje rezultatov tumorskih označevalcev (13).

1.6.1. Priporočila NACB in EGTM za klinično uporabo PSA pri karcinomu prostate

1. Skupini NACB in EGTM sta sprejeli priporočila Ameriškega društva za karcinome, da za postavitev diagnoze ne smemo uporabljati samo testa PSA, ampak naj bi se uporabljal skupaj z DRP;
2. Zaradi polemike glede uporabe PSA za detekcijo zelo malih tumorjev, se nizka prazna vrednost (2 µg/L) ne priporoča;
3. NACB strogo priporoča posebne referenčne vrednosti za PSA, za različne starostne skupine in rase, EGTM pa ne priporoča posebnih intervalov za različne starostne skupine;
4. Uporaba deleža fPSA se priporoča kot pomožni označevalec pri razločevanju karcinoma prostate od BHP, kadar je tPSA v mejah 4-10 µg/L pri negativnem DRP.

Potrebna je ustrezna validacija kliničnih meja v odločanju za vsako kombinacijo določanja fPSA in tPSA znotraj vsake ustanove;

5. Priporoča se, da se odvzem krvi izvaja pred kakršno koli manipulacijo na prostati in nekaj tednov po zdravljenju prostatitisa;
6. Priporočila za rokovanje z vzorci:
 - vzorce je treba centrifugirati in serume shraniti pri +4 °C v roku treh ur po odvzemu krvi;
 - vzorci se lahko hranijo pri +4 °C do 24h;
 - vzorce, katerih ne bomo analizirali v roku 24h po odvzemu, je potrebno zamrzniti pri -20 °C ali nižjih temperaturah;
 - za hranjenje vzorcev v daljšem obdobju, je treba vzorce zamrzniti pri -70°C ali nižjih temperaturah;
7. V laboratoriju treba določiti, katera je najnižja merljiva koncentracija in o tem obvestiti klinično osebje in vpeljati kontrolo kakovosti tudi za take nivoje. Upoštevati je treba vpliv intraindividualne biološke variacije (pri tako nizkih koncentracijah je lahko precej visoka);
8. Uporabnike je potrebno informirati:
 - rezultat PSA je potrebno interpretirati skupaj z DRP
 - o nazivu testa
 - o analitični občutljivosti testa
 - o veljavno referenčnem območju, ki je navedeno v uporabi testa
 - upoštevati je treba etnične in regionalne razlike v referenčni populaciji (13).

1.7. METODE ZA DOLOČANJE PSA V SERUMU

Metode, ki jih uporabljamo v laboratorijih za določanje PSA v serumu ali plazmi, slonijo na načelu reakcije antigena in protitelesa. Glede na to, kakšno aparaturo uporabimo za ugotavljanje reakcije, imamo na voljo:

- kemiluminiscenčne metode
- radioimunske metode
- encimskoimunske metode
- fluorimetrične metode in elektroluminiscenčne metode (30).

1.8. PRINCIP DOLOČANJA PSA

- Sendvič princip imunokemijske metode je uporaben za analite z veliko molekulsko maso. Čas trajanja analize je 18 minut.
- V prvi inkubaciji se 20 µl vzorca spaja z reagentom v analizni posodici, ki vsebuje specifična monoklonska PSA protitelesa označena z biotinom in specifična monoklonska PSA protitelesa označena z rutenijevim kompleksom. Med devetminutno inkubacijo, protitelesa ujamejo prisoten PSA v vzorcu, nastane »sendvič kompleks«.
- V drugem koraku se dodajo magnetni mikrodenci, prevlečeni s streptavidinom. Med drugo devetminutno inkubacijo kompleks postane vezan na trdno fazo po interakciji biotina in streptavidina.
- Po drugi inkubaciji se reakcijska mešanica, ki vsebuje imunske komplekse prenese v merilno celico, imunski kompleksi se zaradi delovanja magnetne sile ujamejo na površino elektrode, nevezani reagent in vzorec pa se spereta z spiralno tekočino ProCell. Napetost na elektrodi povzroči oksidacijo rutenijeve spojine z tripropilaminom v vzbujeno stanje, pri prehajanju v prvotno stanje pa emitira svetlobo pri 620 nm, ki jo merimo s fotoočevalcem. Elecsys 2010 avtomatično izračuna koncentracijo vsakega vzorca za tPSA iz umeritvene krivulje, ki jo dobimo s kalibracijo parametra (39).

2. NAMEN DELA

Rak prostate je obolenje, ki je pri moških vedno pogostejše. Z napredkom v diagnostiki in zdravljenju raka prostate se zmanjšuje umrljivost moških zaradi te bolezni, ki prehaja iz agresivnega obolenja v kronično obolenje starejših moških. Karcinom prostate sodi med osrednje strokovne in zdravstveno-raziskovalne probleme urološke patologije. Za njegovo zgodnje odkrivanje so danes na voljo že številne sodobne preiskovalne metode. Povišana vrednost PSA poda sum na prisotnost raka prostate in zahteva dodatne diagnostične postopke. Vrednost PSA je lahko zvišana tudi pri benigni hiperplaziji prostate in vnetju prostate. Z uporabo PSA se je izboljšala diagnostika raka prostate, kar pripomore odkritju novotvorbe v stadiju, ko ni tipen pri digitorektalnem pregledu prostate.

Namen diplomskega dela je uvedba določanja PSA v serumu z elektroluminiscenčno imunokemijsko metodo na analizatorju ELECSYS 2010 proizvajalca Roche Diagnostics.

Izvedli bomo verifikacijo analizne metode, v katero bomo vključili ugotavljanje natančnosti, točnosti in linearnost metode. S tem procesom želimo potrditi, da naš analizni postopek določanja PSA v serumu daje ustrezne rezultate.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

Za analizo smo uporabili serumske vzorce šestdesetih moških preiskovancev, ki so bili obravnavani v naši ustanovi, Bolnišnica Golnik – klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo. Po končanih analizah, naročenih s strani kliničnih oddelkov in ambulant, smo preostanke serumov shranili v zaprte plastične vial v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Kri je bila odvzeta v epruvete z ločevalnim gelom brez dodanega antikoagulant po standardnem postopku za odvzem krvi. Upoštevali smo, da je stabilnost PSA v serumu 5 dni pri 2-8 °C in 6 mesecev pri temperaturi -20 °C. Starost preiskovancev je bila 20-94 let. Pred določanjem serumskega PSA smo vzorce serumov odmrznili pri sobni temperaturi ter previdno in dobro premešali. Tako homogeniziranim serumskim vzorcem smo določili prisotnost tumorskega označevalca PSA.

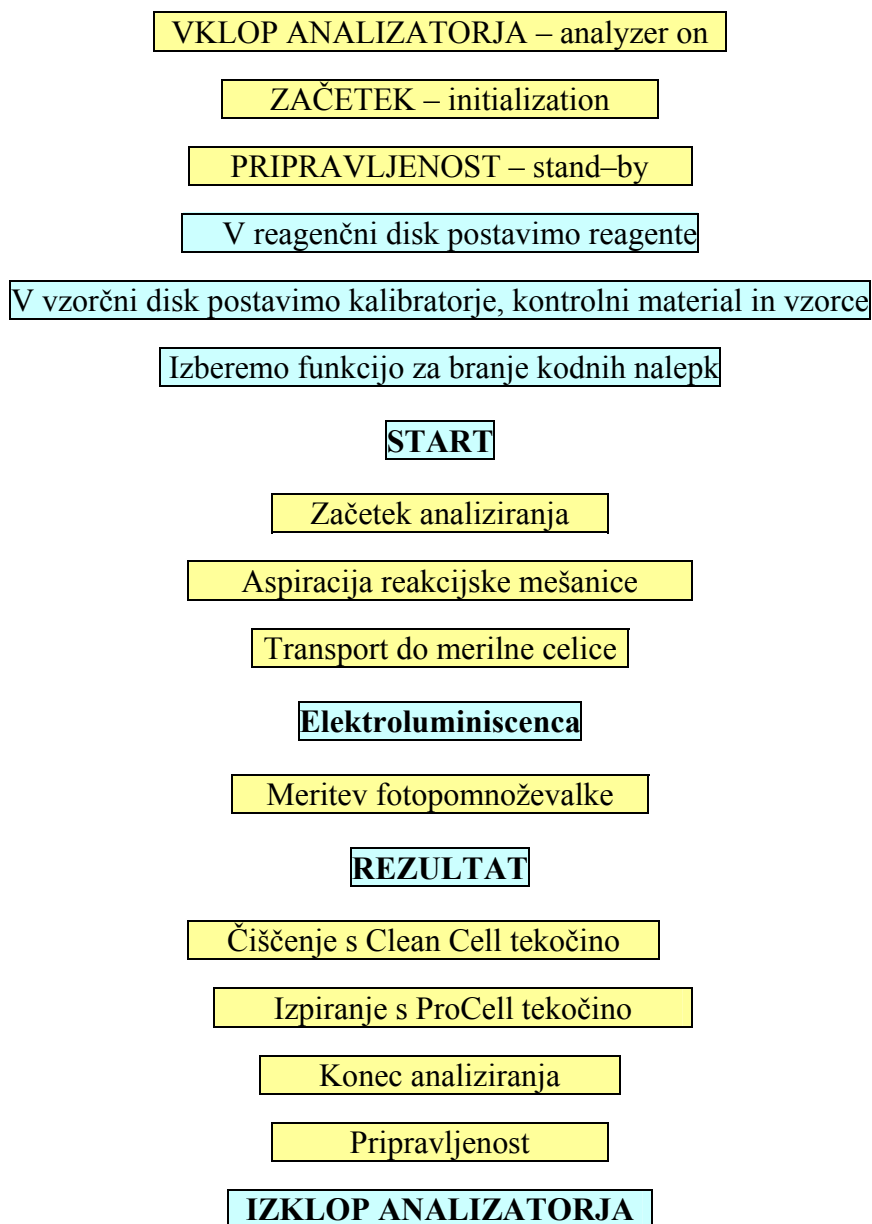
3.2. METODA ZA DOLOČANJE CELOTNEGA PSA (tPSA)

Koncentracije celotnega PSA (tPSA) smo določali na avtomatskem analizatorju Elecsys 2010 proizvajalca Roche Diagnostics. Analizator za določanje parametrov uporablja elektroluminiscenčno imunokemijsko metodo –(electrochemiluminescence immunoassay – ECLIA). Elektrokemiluminiscentni (ECL) procesi potekajo pri molekulah, ki vključujejo številne spojine rutenija, osmija, renija ali drugih elementov. ECL je proces, pri katerem nastajajo visoko reaktivne zvrsti iz stabilnih prekurzorjev na površini elektrode. Med detekcijsko fazo se tvori končni kemiluminiscentni produkt, emisija svetlobe, ki jo sprožimo z električnim signalom (39).

3.2.1. Funkcionalna zaporedja sistema

Splošno analizno zaporedje imunokemijske metode ECL je sestavljeno iz različnih stopenj pipetiranja, inkubacije in meritve. Vzorec, reagent in mikrodelci se pipetirajo v analizne posodice. Temperatura v sistemu se precizno vzdržuje na 28 °C ($\pm 0,3$ °C). Imunokemijska reakcija se izvaja v analiznih posodicah v inkubatorju pri konstantni temperaturi 37 °C ($\pm 0,3$ °C). Po določenem času inkubacije se reakcijska zmes aspirira v merilno celico, kjer

poteka proces meritve. Vsak krog pipetiranja se izvrši v približno šesdesetih sekundah. Po vsakem koraku pipetiranja se mešalec za mikrodelce in sesalna sonda avtomatično očistita. Naslednji koraki so prilagojeni principu metod. Zaporedja posameznih procesov se razlikujejo od testa do testa (39). Analizna zaporedja potekajo po določenem sistemu, ki jih prikazuje slika 1.



Slika 1: *Analizna zaporedja*

3.3. OPREMA IN REAGENTI ZA DOLOČANJE *t*PSA

Za določanje celotnega PSA v serumu smo uporabili imunokemijski analizator Elecsys 2010 (slika 2), reagente (slika 3), kemikalije in dodatni material proizvajalca Roche Diagnostics GmbH – Mannheim (Preglednica III).



Slika 2: Imunokemijski analizator Elecsys 2010



Slika 3: Reagent in kalibracijski ali kontrolni set za določanje *t*PSA

Preglednica III: Oprema, reagenti, kemikalije in dodatni material

Oprema proizvajalca Roche Diagnostics GmbH - Mannheim
Imunokemijski analizator Elecsys 2010
Reagenti proizvajalca Roche Diagnostics GmbH - Mannheim
Kontrolni tumorski označevalec 1 in 2 – Preci Control Tumor Marker (PC TM1/PC TM2)
Kalibracijski set – total PSA Cal Set (Cal 1, Cal 2)
total PSA reagent (free+complexed) za 100 določitev
Kemikalije in material proizvajalca Roche Diagnostics GmbH - Mannheim
Spiralna tekočina – Pro Cell
Čistilna tekočina – Clean Cell
Čistilna tekočina za sistemsko čiščenje analizatorja – Sys Clean
Adapter za sistemsko čiščenje s Sys Clean tekočino
Posodice za kontrolni material – Control Set Vials
Posodice za kalibratorje – Cal Set Vials
Reakcijske posodice – Assay Cup
Nastavki za pipetiranje – Assay Tip
Posodice za vzorce – Sample Cups
Posoda za trde odpadke (nastavki, reakcijske posodice) Waste Liner, wast bags

ProCell je sistemska raztopina za pomnoževanje elektrokemijskega signala v imunokemijskih sistemih. Njena naloga je predpriprava elektrode, prenašanje reakcijske mešanice v testu, izpiranje mikrodlecev vezanih za streptavidin iz merilne celice in pomnoževanje signala. ProCell je sistemski pufer, sestavljen iz fosfatnega pufra 300 mmol/L, tripropylamine 180 mmol/L (TPA), detergent $\leq 0,1$ %, konzervans, pH 6,8. Pri delu smo upoštevali stabilnost reagenta, ki je neodprt in hranjen pri 15-20 °C uporaben do datuma, ki je označen na embalaži reagenta.

CleanCell je raztopina za čiščenje merilne celice imunokemijskega analizatorja. Uporablja se skupaj s testnimi reagenti. Naloga raztopine CleanCell je čiščenje cevne sistema in merilne celice po vsakem merjenju. Vsebuje 176 mmol/L kalijevega hidroksida (KOH), detergent ≤ 1 %, pH 13,2. Upoštevali smo, da je uporabnost in stabilnost reagenta odvisna od hranjenja pri 15-20 °C. Pri uporabi raztopine CleanCell smo upoštevali standardna

obvestila o nevarnih snoveh in vse varnostne ukrepe glede njegove dražilne značilnosti (slika 4).



CleanCell: XI – DRAŽILNO

R36/38 Draži oči in kožo

S26 Če pride v stik z očmi, takoj izpirati z obilo vode in poiskati zdravniško pomoč.

Slika 4: Standardno obvestilo za raztopino Clean Cell

SysWash je koncentrirana raztopina, ki smo jo uporabljali za spiranje sistema. Z demineralizirano vodo smo pripravili 10 % raztopino SysWash.

Čistilo SysClean smo uporabljali pri 14-dnevem vzdrževanju imunokemijskega analizatorja.

Kalibracijski komplet Elecsys total PSA Cal Set II (Cal1, Cal2)

Kalibracijski komplet smo uporabljali za kalibracijo meritve tPSA na analizatorju tPSA test je standardiziran po priporočilu Stanford Reference Standard (90 % ***PSA–ACT + 10 % fPSA) (40). Sestavljen je iz liofiliziranega humanega seruma z dodanim humanim PSA v dveh koncentracijskih nivojih. V kalibratorju 1 je koncentracija PSA 0 µg/L (PSA Cal1) in v kalibratorju 2 je koncentracija PSA 60 µg/L (PSA Cal2). Vsi podatki o specifični seriji kalibratorja so zakodirani na črtni kodi kalibratorja in na črtni kodi kartice kalibratorja. Ti podatki so potrebni za kalibracijo tPSA testa skupaj s podatki, ki so na črtni kodi reagenta.

Priprava kalibratorja

Liofilizirane kalibratorje (Cal1, Cal2), smo previdno raztopili z 1ml destilirane vode, in pustili stati 15 minut, da so se popolnoma raztopile. V tem času smo kalibrator večkrat rahlo premešali, ne, da bi se penilo. Pripravljene kalibratorje smo razdelili v štiri alikvote po 250 µl, v označene posodice za kalibratorje s priloženimi kodnimi nalepkami za vsak nivo kalibratorja. En komplet pripravljenega kalibratorja smo uporabili za kalibracijo tPSA testa, ostale tri alikvote smo zamrznili na -20 °C. Pred meritvijo smo kalibratorje ogrevali 10-15 minut pri sobni temperaturi (20-25 °C).

Elecsys PreciControl Tumor Marker (PC TM1, PC TM2)

PreciControl Tumor Marker vsebuje liofiliziran kontrolni serum, humanega izvora. Koncentracije so v dveh klinično ustreznih nivojih (PC TM1, in PC TM2). Kontrolni material smo uporabljali za nadzor točnosti in preciznosti analizatorja. Pred meritvijo smo kontrolni material 10-15 minut ogrevali pri sobni temperaturi (20-25 °C). Kontrolo kakovosti smo izvajali dnevno, vzporedno z analizo vzorcev in pri izvajanju kalibracije.

Priprava kontrolnega materiala

Liofiliziran kontrolni serum (PC TM1, PC TM2), smo previdno raztopili s 3ml destilirane vode in pustili stati 30 minut, da se je popolnoma raztopil. V tem času smo kontrole večkrat rahlo premešali. Pripravljen kontrolni serum smo razdelili na štiri alikvote po 500 µL v označene posodice za kontrolni material s priloženimi kodnimi nalepkami za vsak nivo kontrol. En komplet pripravljenih kontrol smo uporabili za izvajanje kontrole kakovosti, ostale tri alikvote pa smo zamrznili pri -20 °C.

Total PSA reagent

tPSA reagent kit – delovna raztopina

M Mikrodelci prevlečeni s streptavidinom (bel pokrovček), 1 steklenička 6,5 mL: mikrodelci prevlečeni s streptavidinom, 0,72 mL, vezalna kapaciteta: 470 ng/mg mikrodelcev; konzervans.

R1 Anti-PSA biotinilirano protitelo (siv pokrovček), 1 steklenička, 10 mL: biotinilirana monoklonalna anti-PSA protitelesa (mišja) 1,5 mg/L; fosfatni pufer 100 mmol/L, pH 6,0; konzervans.

R2 Anti-PSA-Ab~Ru(bpy)₃²⁺ (črn pokrovček), 1 steklenička, 10 mL: monoklonska anti-PSA protitelesa (mišja) označena z rutenijevo spojino 1,0 mg/L; fosfatni pufer 100 mmol/L, pH 6,0; konzervans.

* Tris (2,2-bipyridil) rutenij (II) - (Ru(bpy)₃)²⁺

Reagent je pripravljen za uporabo

Hranjenje in stabilnost reagenta

PSA Reagent smo hranili v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C, v pokončnem položaju, da smo pred uporabo zagotovili popolno uporabnost mikrodelcev med avtomatskim mešanjem.

Kalibratorje, kontrolni material in reagent za določanje tPSA smo uporabljali za in vitro diagnostiko. Z vsem biološkim materialom smo ravnali kot z možno infektivnim. Po uporabi smo odpadni material odstranili v zabojnik za zbiranje bioloških odpadkov.

3.4. STATISTIČNE METODE

Podatke smo analizirali s pomočjo programa Microsoft Office Excel in statističnega paketa SPSS. Osnovne opisne metode v tej nalogi so prikazi porazdelitev podatkov v obliki frekvenc, histogramov, grafične porazdelitve srednjih vrednosti in intervalov zaupanja.

Aritmetična sredina ($\bar{X}$) – srednja vrednost, kot ena od mer centralnih vrednosti podatkov je definirana kot vsota vseh vrednosti, deljena s številom enot, na katerih je bila spremenljivka izmerjena.

Koeficient variacije (KV) je relativna mera razpršenosti in je kvocient med standardnim odklonom in aritmetično sredino.

Mediana (Me) je druga najpogostejša mera centralnih vrednosti in je srednja vrednost v ranžirni vrsti, od katere ima 50 % enot manjšo vrednost in 50 % enot višjo vrednost.

Standardna deviacija (SD) je ena izmed mer razpršenosti (variabilnosti). Definirana je kot kvadratni koren iz variance, ki je prav tako ena izmed mer razpršenosti.

Za analizo ponovljivosti izven serije, smo v tej nalogi uporabili **Wilcoxonov test predznačenih rangov**, ki je bil primeren za analizo statističnih razlik med rezultati istega vzorca po dnevih. Ta test je neparametrični ekvivalent **t-testu** in ustreza tipu podatkov, pri katerih normalne porazdelitve ne pričakujemo, takrat ko želimo ugotoviti ali se dve skupini razlikujeta po neki zvezni spremenljivki.

F-test je testiranje razlik med variancami. Enosmerna analiza variance –ANOVA. Preverjanje razlik med aritmetičnimi sredinami centralnih vrednostih spremenljivk, ki so razdeljene v dve ali več skupin, smo ocenili na podlagi F-statistike.

Chronbach alfa je koeficient zanesljivosti, metoda za ugotavljanje konsistentnosti merskih podatkov. V primeru naše naloge so to ponovitve znotraj istega dne in med dnevi. Izračun koeficienta **alfa** temelji na variancah in kovariancah med merjenimi spremenljivkami, ki merijo isti konstrukt. α je definirana na intervalu [0, 1]. Če je vrednost α večja od 0,80, pravimo, da je meritveni postopek zanesljiv.

Ničelna hipoteza H_0 predpostavlja, da ne obstaja razlika med parametri, ki jih primerjamo, če pa že obstaja kakšna razlika, le ta ni statistično značilna in je le slučajna.

Za testiranje značilnosti razlik med eksperimentalnimi in teoretičnimi vrednostmi smo uporabili **razmerje obetov**, ki je vzorčna statistika in oceni razliko med empirično, pridobljeno porazdelitvijo dveh spremenljivk in teoretično, oziroma pričakovano, v njunem skupnem dvo razsežnem prostoru. S tem testiranjem smo ugotovili kakšna je točnost oziroma pravilnost naše metode (recovery test).

Paersonov koeficient korelacije smo uporabili pri ugotavljanju linearnosti metode, ki je matematična in statistična številska mera, ki predstavlja velikost linearne povezanosti spremenljivk X in Y , merjenih na istem predmetu preučevanja.

3.5. VERIFIKACIJA METODE

V verifikacijo kemiluminiscentne metode določanja koncentracije PSA v serumu smo vključili ugotavljanje:

- **natančnosti**
- **točnosti in**
- **linearnost metode.**

3.5.1 Natančnost metode

(Precision) smo izvajali na dva načina:

- a) z meddnevno ponovljivostjo vzorcev izven serije (intermediate precision) in
 - b) s ponovljivostjo vzorcev v seriji (repeatability)
- a) Za ugotavljanje natančnosti metode izven serije na imunokemijskem analizatorju, smo izvajali meritve za določanje koncentracije PSA v serumu šestdesetim vzorcem. Izvedli smo ponovljivost izven serije v treh zaporednih dneh. Želeli smo ugotoviti, koliko rezultati meritev nihajo v časovnem obdobju treh zaporednih dni. Meritve smo izvajali pri ponovljivih pogojih in za te meritve uporabili isti analizator, isti kontrolni material in reagent proizvajalca Roche Diagnostics, ob izvajanju istega analitika.
- b) Za ugotavljanje natančnosti metode v seriji smo izvajali meritve za določanje koncentracije PSA v serumu treh vzorcev različnih koncentracij. Za vsak vzorec smo izvedli ponovljivost v seriji v desetih meritvah. To ponovljivost smo izvajali v treh zaporednih dneh.

3.5.2. Točnost metode

S postopkom točnost oziroma pravilnost metode (Accuracy) smo želeli ugotoviti, če bomo z uporabo omenjene analitske metode dobili pravilne rezultate. Ugotavljali smo stopnjo ujemanja rezultatov izmerjenih z našo metodo, s pravo vrednostjo referenčne metode. Pričakovano vrednost smo dobili z dodajanjem znane koncentracije merjene komponente v matrično raztopino in merjenjem pripadajočih signalov. Med pričakovano in dobljeno vrednostjo smo izračunali odstotek ujemanja. Za znano koncentracijo smo uporabili kontrolo kakovosti z nizko koncentracijo PSA (PC TM1) in z visoko koncentracijo PSA (PC TM2).

3.5.3. Linearnost metode

Ugotavljali smo, kakšna je zmožnost izbrane metode, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije iskanega analita v vzorcu. Iz vzorcev treh različnih koncentracij smo pripravili ustrezne razredčitve. Za izračun linearne odvisnosti spremenljivk smo uporabili *Pearsonov koeficijent korelacije*. Pogoji za računanje tega koeficienta je linearna odvisnost obeh vpletenih spremenljivk. Rezultate smo predstavili grafično in izračunali delež pravilnosti izražen v odstotkih (recovery %).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. NATANČNOST METODE

a) Opisne statistike za meddnevno ponovljivost izven serije šestdesetih vzorcev (intermediate precision)

Pri koeficientu zanesljivosti (reliability) za šestdeset vzorcev pričakujemo enake variance med dnevi. Za vsak dan smo šestdesetim vzorcem ($n=60$) določili aritmetično sredino, koeficient variacije, standardno deviacijo in mediano (Preglednica IV). V okviru teh treh dni predpostavljamo, da je obstojnost PSA v vzorcu nespremenjena in je rezultat analize neodvisen od dneva analize. Iz preglednice V je razvidno, da je povprečna vrednost PSA prvi dan znašala 1,479 $\mu\text{g/L}$, drugi dan se je znižala na 1,390 $\mu\text{g/L}$, tretji dan pa se je zvišala na 1,641 $\mu\text{g/L}$. Standardna deviacija, ki meri absolutno razpršenost vrednosti je najvišja tretji dan (1,693 $\mu\text{g/L}$), najnižja pa drugi dan (1,438 $\mu\text{g/L}$). Za primerjavo razpršenosti smo izbrali koeficient variacije (KV), ki je relativna mera razpršenosti in je kvocient med standardno deviacijo (σ - *sigma*) in aritmetično sredino (μ) in ga izračunali po enačbi 1.

$$KV = \frac{\sigma}{\mu}$$

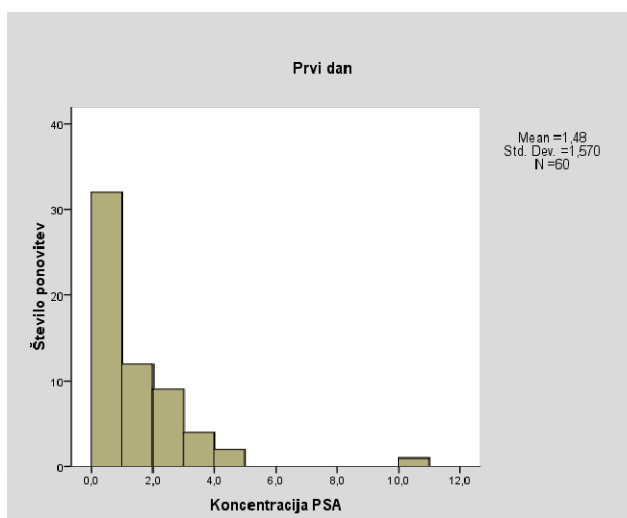
Enačba 1: Izračun koeficienta variacije

Najnižji KV je bil določen prvi dan z vrednostjo 0,154 %, kar kaže na največjo homogenost rezultatov, vendar pa se razpršenost drugi in tretji dan za malenkost zviša na 0,158 %. Najnižja vrednost koncentracije PSA prvi in drugi dan znaša 0,056 $\mu\text{g/L}$ oziroma 0,053, tretji dan pa se zviša na 0,137 $\mu\text{g/L}$. Najvišja vrednost koncentracije PSA znaša prvi dan 10,190 $\mu\text{g/L}$, drugi dan se zmanjša na 9,080, tretji dan pa se spet zviša na 10,700 $\mu\text{g/L}$. Mediana je prvi dan znašala 0,932 $\mu\text{g/L}$, drugi dan se je znižala na 0,884, tretji dan pa se je zvišala na 1,085 $\mu\text{g/L}$.

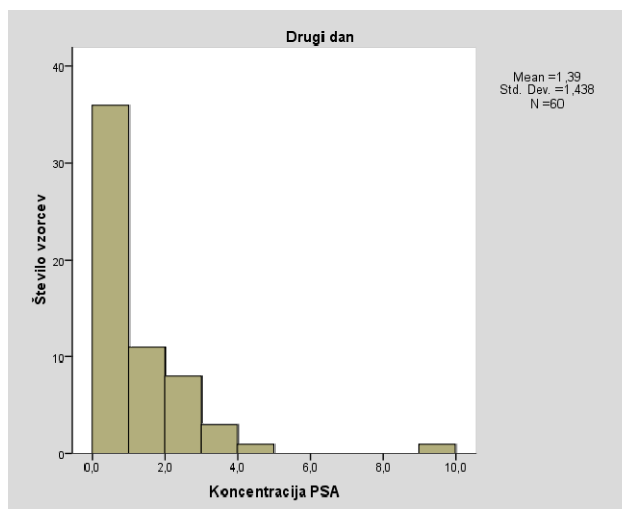
Preglednica V: Meddnevna ponovljivost vzorcev izven serije šestdesetih vzorcev v treh zaporednih dneh. Statistična obdelava rezultatov $\bar{X}$ =aritmetična sredina, KV =koeficient variacije, SD =standardna deviacija, Me =mediana

	<i>n</i> =	Najnižja vrednost $\mu\text{g/L}$	Najvišja vrednost $\mu\text{g/L}$	$\bar{X}$ $\mu\text{g/L}$	<i>KV</i> %	<i>SD</i> $\mu\text{g/L}$	<i>Me</i> $\mu\text{g/L}$
prvi dan	60	0,056	10,190	1,479	0,154	1,570	0,932
drugi dan	60	0,053	9,080	1,390	0,158	1,438	0,884
tretji dan	60	0,137	10,700	1,641	0,158	1,693	1,085

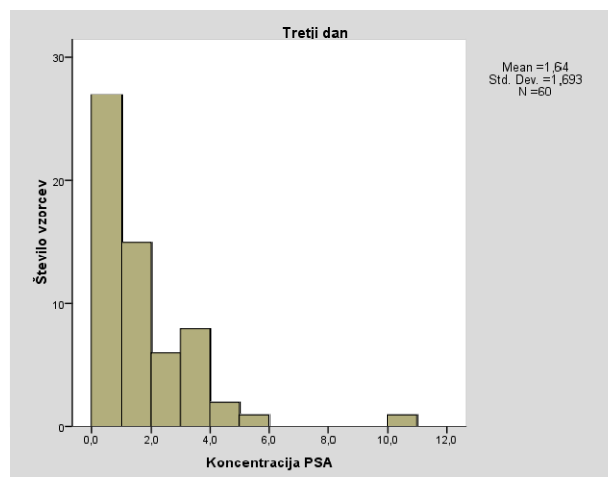
Iz grafičnih prikazov šestdesetih meritev vidimo predvsem večja odstopanja pri meritvah drugi in tretji dan pri vzorcih z nizko koncentracijo PSA (0,056-1,00 $\mu\text{g/L}$). Pri vzorcih s koncentracijo PSA večjo od 1,00 $\mu\text{g/L}$ zaznamo odstopanja meritev, katera so največja tretji dan, bodisi znižanje ali zvišanje koncentracije (Slika 5, 6, in 7).



Slika 5: Grafični prikaz meritev vzorcev prvi dan



Slika 6: Grafični prikaz meritev vzorcev drugi dan



Slika 7: Grafični prikaz meritev vzorcev tretji dan

Rezultati *statistične zanesljivosti meritev* so pokazali, da je koeficient zanesljivosti 0,995 (Preglednica VI).

Preglednica VI: Statistika zanesljivosti meritev

Statistika zanesljivosti	
Aritmetična sredina	1,503
Povprečje varianc	2,477
Varianca prave vrednosti	2,442
Varianca napak	0,035
Korelacija med spremenljivkami	0,986
Stopnja zanesljivosti	0,995
Stopnja zanesljivosti (nepristranska)	0,995

Za ugotavljanje statistično značilnih razlik za šestdeset vzorcev med posameznimi dnevi smo uporabili neparametrični *Wilcoxonov test* predznačenih rangov, saj so rezultati meritev nenormalno porazdeljeni. Pri tem smo primerjali posamezne pare dnevov, kar je razvidno iz Preglednice VII.

Preglednica VII: *Wilcoxonov test predznačenih rangov*. Ugotavljanje statistično značilnih razlik med posameznimi dnevi

Rangi		<i>n</i> =	Povprečni rang	Vsota rangov
drugi dan – prvi dan	Negativen rang	58	30,16	1749,50
	Pozitiven rang	1	20,50	20,50
	Skupaj	60		
tretji dan – prvi dan	Negativen rang	1	10,00	10,00
	Pozitiven rang	59	30,85	1820,00
	Skupaj	60		
tretji dan – drugi dan	Negativen rang	0	,00	,00
	Pozitiven rang	60	30,50	1830,00
	Skupaj	60		

Ugotovili smo, da med rezultati povprečij rangov parov obstajajo statistično značilne razlike $p < 0,05$ (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: *Z statistika* – povprečje rangov parov

	drugi dan – prvi dan	tretji dan – prvi dan	tretji dan – drugi dan
<i>Z statistika</i>	-6,526	-6,662	-6,736
<i>p</i>	,000	,000	,000

b) ponovljivost v seriji treh vzorcev desetih ponovitev (repeatability)

Izbrali smo tri serumske vzorce z različno koncentracijo PSA in izvedli deset ponovitev v treh zaporednih dneh. Vsakemu vzorcu za vsak dan posebej smo določili najmanjšo in najvišjo vrednost, aritmetično sredino, koeficient variacije, standardni odklon in mediano (Preglednica IX). Zanimalo nas je ali je skladnost rezultatov v seriji enaka, ne samo znotraj istega dne ampak tudi med drugimi dnevi. Torej, ali je vseeno, če od enega vzorca vzamemo katerikoli rezultat istega dne in rezultat kateregakoli dne, torej katerikoli rezultat od tridesetih izmerjenih.

Predpostavka je, da ponovitve analiz določenega vzorca dajo enake rezultate v vseh desetih ponovitvah istega dne. Postavimo *ničelno hipotezo* (H_0) po enačbi 2. To predpostavko smo testirali z enosmerno analizo variance (Preglednica XI).

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Enačba 2: Ničelna hipoteza

Pred izvedbo analize variance smo se prepričali, da so variance opazovanih setov homogene. Za to ugotovitev smo uporabili *Levenov test homogenosti varianc*, ki se je pokazal statistično neznačilen ($p > 0,05$), kar pomeni, da je variabilnost ponovitev znotraj ponovitev enega dneva homogena (Preglednica X).

Preglednica X: Levenov test homogenosti varianc

	<i>Levenova statistika</i>	sp med skupinami	sp znotraj skupin	<i>p</i>
prvi dan	0,000	9	20	1,000
drugi dan	0,001	9	20	1,000
tretji dan	0,003	9	20	1,000

Rezultati *F-testa* kažejo, da ni statistično značilnih razlik med ponovitvami istega vzorca v okviru istega dne. Če ponavljamo vzorec isti dan je rezultat katerekoli ponovitve analize enak. Majhna vrednost *F* in verjetnost *p* = 1, pomeni, da se povprečja skupin ne razlikujejo

statistično značilno. V vseh treh dneh znaša F preizkus 0 , torej ne moremo zavrniti ničelne hipoteze enosmerne analize varianc o obstoju razlik v povprečnih vrednostih znotraj posameznih dni. Ničelno hipotezo obdržimo, analiza pokaže, da ne obstajajo statistično značilne razlike med ponovitvami po dnevih – *ANOVA*: $p > 0,05$ (Preglednica XI).

Preglednica XI: *ANOVA – Enosmerna analiza varianc* – testiranje razlik med variancami

<i>ANOVA</i>						
		Vsota kvadratov odklonov	sp	Povprečni kvadrat odklonov	<i>F</i>	<i>p</i>
prvi dan	Med skupinami	0,010	9	0,001	0,000	1,000
	Znotraj skupin	475,735	20	23,787		
	Skupaj	475,745	29			
drugi dan	Med skupinami	0,024	9	0,003	0,000	1,000
	Znotraj skupin	666,730	20	33,336		
	Skupaj	666,754	29			
tretji dan	Med skupinami	0,090	9	0,010	0,000	1,000
	Znotraj skupin	648,939	20	32,447		
	Skupaj	649,029	29			

Neparametrični *Wilcoxonov test predznačenih rangov* smo uporabili za testiranje razlik med rezultati istega vzorca po dnevih, pri ugotavljanju ponovljivosti v seriji. Ugotovili smo, da so povprečni rezultati istega vzorca različni od dneva do dneva. Dobili smo statistično značilne razlike med rezultati vzorcev prvega in drugega dne in prvega in tretjega dne $p < 0,05$. Statistično neznačilno različni pa so rezultati med drugim in tretjim dnevom $p > 0,05$ (Preglednica XII in XIII). Ugotovimo torej, da je izbor dneva pomemben za določanje koncentracije PSA, ker je od izbora dneva odvisna vrednost rezultata. To pomeni, da bomo dobili bolj natančne rezultate, če bomo analizo izvajali tekom 24h po odvzemu vzorca, če to ne bo možno bomo vzorce zamrznili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica št. XII: Ponovljivosti v seriji – Wilcoxonov test predznačenih rangov.
Testiranje razlik med rezultati istega vzorca po dnevih

Rangi				
		n=	Srednja vrednost rangov	Vsota rangov
drugi dan – prvi dan	Negativen rang	0	0,00	0,00
	Positiven rang	30	15,50	465,00
	Skupaj	30		
tretji dan – prvi dan	Negativen rang	0	0,00	0,00
	Positiven rang	30	15,50	465,00
	Skupaj	30		
tretji dan – drugi dan	Negativen rang	13	19,50	253,50
	Positiven rang	15	10,17	152,50
	Skupaj	30		

Preglednica št. XIII: Z statistika – povprečje rangov parov

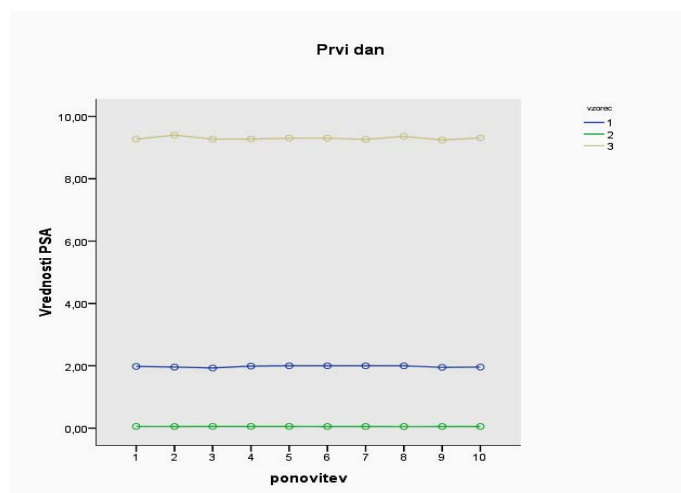
	drugi dan – prvi dan	tretji dan – prvi dan	tretji dan – drugi dan
Z statistika	-4,785	-4,783	-1,151
p	,000	,000	,250

Skladnost ponovitev vzorcev v seriji – zanesljivost meritev

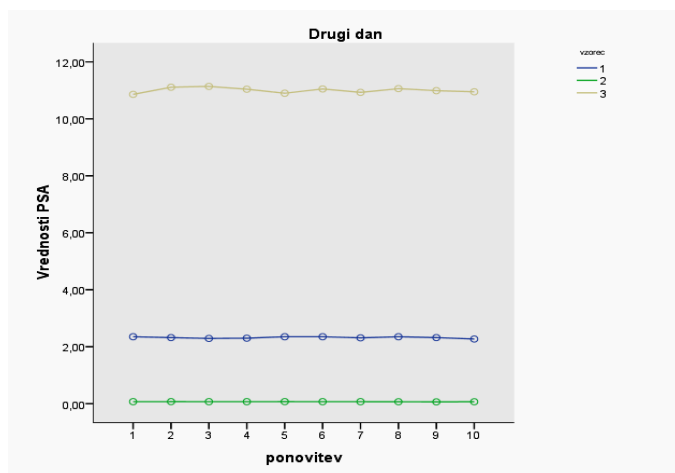
Za deset zaporednih ponovitev treh izbranih vzorcev lahko izračunamo njihovo skladnost v istem dnevu in skladnost med dnevi. **Cronbachova alfa** za skladnost ponovitev med dnevi znaša 0,984, skladnost ponovitev v enem dnevu pa 0,995 (Preglednica XIV). To nam pove, da so ponovitve znotraj istega dne skoraj identične, meritveni postopek pa zanesljiv, kar je tudi razvidno iz grafičnih prikazov za posamezni dan (Slika 8-10).

Preglednica XIV: Zanesljivost meritev

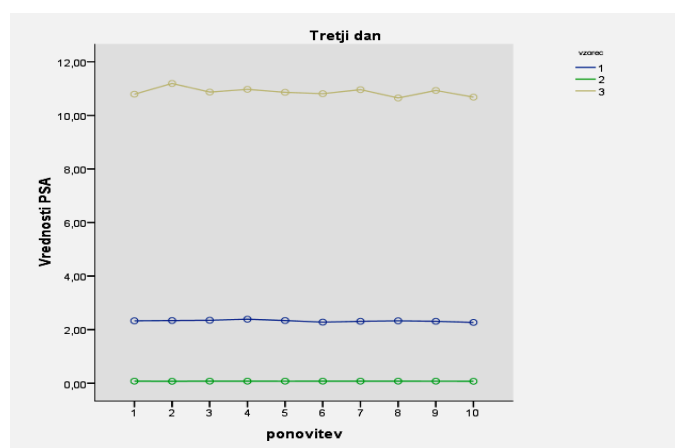
Statistika zanesljivosti	
Aritmetična sredina	4,222
Povprečje varianc	20,691
Varianca prave vrednosti	20,375
Varianca napak	0,316
Korelacija med spremenljivkami	0,984
Stopnja zanesljivosti – Cronbach Alpha	0,995
Stopnja zanesljivosti (nepristranska)	0,995



Slika 8: Deset zaporednih ponovitev treh izbranih vzorcev – PRVI DAN



Slika 9: Deset zaporednih ponovitev treh izbranih vzorcev – DRUGI DAN

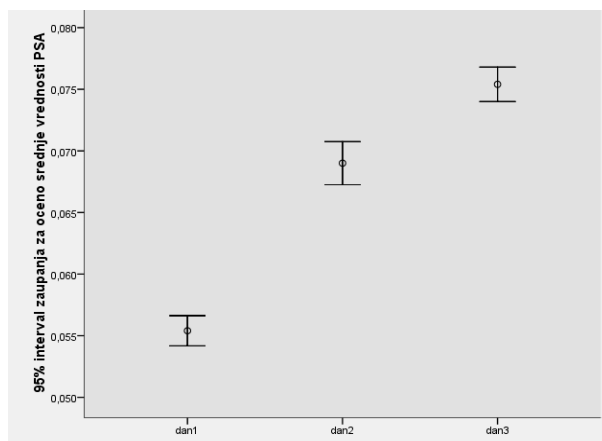


Slika 10: Deset zaporednih ponovitev treh izbranih vzorcev – TRETJI DAN

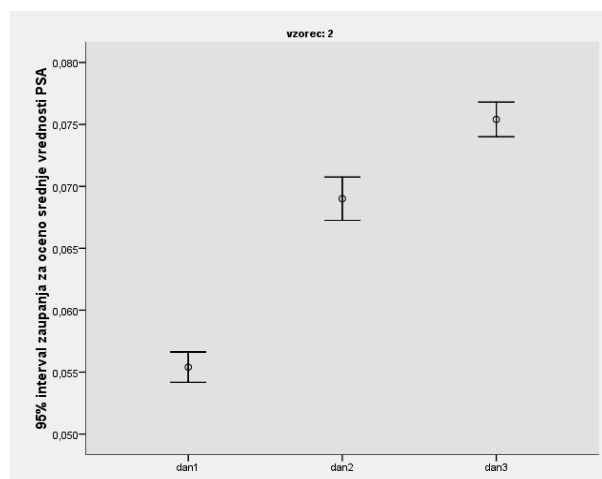
V prvem dnevu znaša za prvi vzorec povprečna vrednost 0,055 $\mu\text{g/L}$, drugi dan 0,069, tretji dan pa 0,075 $\mu\text{g/L}$. Glede na to, da se intervali zaupanja med seboj ne prekrivajo, lahko povzamemo, da se vrednosti po posameznih dneh med seboj razlikujejo, in sicer so vsak dan višje (Slika 11).

Za drugi vzorec se povprečna vrednost v prvem dnevu razlikuje glede na drugi in tretji dan, medtem, ko se med drugim in tretjim dnem ne razlikujejo, saj se intervala zaupanja prekrivata (Slika 12).

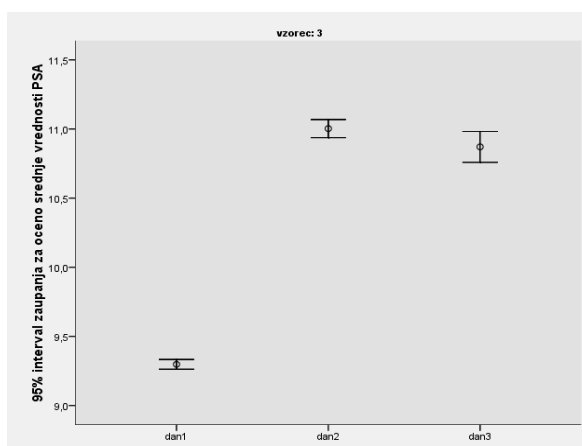
Pri tretjem vzorcu je prvi dan izrazito nizka povprečna vrednost medtem, ko se med drugim in tretjim dnevom povprečni vrednosti med seboj ne razlikujeta, saj se intervala zaupanja med seboj prekrivata (Slika 13). Ugotovimo lahko, da je skladnost ponovitev med dnevi pri vzorcu z nizko koncentracijo PSA slabša kot je skladnost ponovitev pri vzorcih z višjo koncentracijo PSA v serumu.



Slika 11: *Aritmetične sredine z intervali zaupanja za vzorec 1*



Slika 12: *Aritmetične sredine z intervali zaupanja za vzorec 2*



Slika 13: *Aritmetične sredine z intervali zaupanja za vzorec 3*

Po testiranju natančnosti naše metode, ki smo jo izvedli na dva načina:

- c) z meddnevno ponovljivostjo vzorcev izven serije (intermediate precision) in
- d) s ponovljivostjo vzorcev v seriji (repeatability)

smo prišli do ugotovitve, da najbolj natančne rezultate dosegamo, če vzorce analiziramo najkasneje 24 ur po odvzemu, kljub temu, da je naš meritveni postopek zanesljiv, ker smo dosegli visoko skladnost ponovljivosti v enem dnevu in tudi med dnevi. Vzorce katere ne bomo mogli analizirati v istem dnevu, bomo zamrznili na -20°C .

4.2. TOČNOST – PRAVILNOST METODE (Accuracy) z metodo dodatka (recovery test)

Razmerje obetov – Likelihood ratio

Za dokazovanje točnosti smo izbrali štiri vzorce različnih koncentracij (Preglednica XVI). Pričakovano vrednost smo dobili z dodajanjem znane koncentracije vsakemu od vzorcev in zato uporabili kontrolo kakovosti z nizko koncentracijo PSA (PC TM1) in z visoko koncentracijo PSA (PC TM2) (Preglednica XV). Izvedli smo meritve zmesnih vzorcev. Izmerjene koncentracije matričnih vzorcev smo sešteli z znanimi koncentracijami katere smo dodali, delili z dva in tako dobili pričakovane koncentracije PSA. Izračunali smo delež pravilnosti po postopku in ga izrazili v odstotkih. Povprečna vrednost deleža pravilnosti je bila 102,6 %. Najboljše ujemanje smo dosegli pri vzorcu 2, s 100 %

povprečnim ujemanjem. Odstotek odstopanja se giblje od 0 % do 4 %, kar kaže, da smo pri dokazovanju točnosti naše metode dosegli zelo visoko ujemanje z referenčno metodo.

Postopek izračuna deleža pravilnosti izražen v odstotkih (recovery %)

$$X = \frac{\text{izmerjena vrednost} \times 100}{\text{pričakovana vrednost}}$$

Slika 14: Postopek izračuna deleža pravilnosti izražen v odstotkih (recovery %)

Tabela XV: Vrednosti meritvenega intervala kontrole kakovosti

kontrola kakovosti	pričakovana vrednost	območje pričakovane vrednosti µg/L	naša izmerjena vrednost µg/L
PC TM1	3,68	2,91 - 4,45	3,86
PC TM2	35,60	28,1 – 43,1	35,98

Pri dokazovanju točnosti imunokemijske metode z metodo dodatka smo ugotovili, da se izmerjene vrednosti statistično neznačilno razlikujejo od pričakovanih vrednosti, če izmerjenemu vzorcu dodajamo znano koncentracijo PSA (Preglednica XVI).

Preglednica XVI: Točnost – pravilnost metode (Accuracy) z metodo dodatka (recovery test). Razlika med pričakovanimi in izmerjenimi vrednostmi.

Vz.	PSA µg/L	PSA dodan µg/L	pričakovana vrednost	izmerjena vrednost	% pravilnosti	% odstopanja	Razmerje obetov	p
1	0,713	3,68	2,20	2,31	105	5,0	0,000	1,000
1	0,713	35,60	18,16	18,26	101	1,0		
2	1,14	3,68	2,41	2,46	102	2,0	0,188	0,665
2	1,14	35,60	18,37	18,04	98	-2,0		
3	2,55	3,68	3,08	3,20	104	4,0	0,161	0,689
3	2,55	35,60	19,08	19,43	102	2,0		
4	3,06	3,68	3,37	3,56	106	6,0	0,090	0,764
4	3,06	35,60	19,33	19,92	103	3,0		

4.3. TEST LINEARNOSTI

Linearnost analizne metode predstavlja njeno zmožnost, da v določenem območju daje rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije iskanega analita v vzorcu. Za prvi vzorec smo uporabili serum z nizko koncentracijo PSA 1,20 µg/L, za drugega smo uporabili PC TM1 z koncentracijo PSA 3,55 µg/L in za tretji vzorec PC TM2 z visoko koncentracijo PSA 37,6 µg/L. Vzorce smo redčili s kalibratorjem PSA Cal1 z 0 µg/L koncentracijo PSA in pripravili redčitve od 1:3 do redčitve 1:129.

Pripravljenim razredčitvam smo določili koncentracijo PSA in izračunali pričakovane vrednosti za posamezno redčitev. Iz pričakovanih in izmerjenih vrednosti smo izračunali stopnjo pravilnosti (recovery %) (Slika 14). Dobili smo zelo visoke odstotke ujemanja, kar kaže na pravilnost meritev. Najmanjše odstopanje od pričakovanih rezultatov je bilo 0,0 % in 0,8 % pri prvem vzorcu (Preglednica XVI).

Preglednica XVI: Test linearnosti

Vzorec	Razredčitev	Pričakovane vr. PSA µg/L	Izmerjene vr. PSA µg/L	% pravilnosti	% odstopanja
I	nerazredčen	1,200	1,200	100	0,0
	1:3	0,400	0,399	100,0	0,0
	1:5	0,240	0,238	99,2	0,8
	1:9	0,133	0,150	113,0	13,0
	1:17	0,071	0,070	99,2	0,8
	1:33	0,0363	0,037	102,0	2,0
	1:65	0,0184	0,016	86,7	13,3
	1:129	0,0093	0,011	118,0	18,0
II	nerazredčen	3,550	3,550	100	0,0
	1:3	1,183	1,210	102,0	2,0
	1:5	0,710	0,750	106,0	6,0
	1:9	0,394	0,448	114,0	14,0
	1:17	0,209	0,205	98,3	1,7
	1:33	0,108	0,114	106,0	6,0
	1:65	0,055	0,060	110,0	10,0
	1:129	0,0275	0,017	61,7	38,3
III	nerazredčen	37,600	37,600	100	0,0
	1:3	12,53	12,900	103,0	3,0
	1:5	7,52	7,810	104,0	4,0
	1:9	4,18	4,410	106,0	6,0
	1:17	2,21	2,530	114,0	14,0
	1:33	1,139	1,340	118,0	18,0
	1:65	0,578	0,614	106,0	6,0
	1:129	0,291	0,356	122,0	22,0

Zanimalo nas je tudi, če smo z našo metodo v določenem območju meritve dosegli povezanost (korelacijo) spremenljivk in kakšna je oblika vezi in njena jakost. Izvedli smo analizo linearne korelacije, ki proučuje, kako dobro izbrana regresijska premica povezuje količini x in y . Izbrali smo Pearsonov koeficient korelacije r kjer sta x (pričakovane) in y (izmerjene) vzorčne srednje vrednosti spremenljivk iz preglednice XVI, in ga izračunali na podlagi kovariance in standardnih odklonov serij obeh spremenljivk po **enačbi 3**.

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

Enačba 3: Pearsonov koeficient korelacije

Vrednosti spremenljivk vseh treh vzorcev iz preglednice XVI smo predstavili grafično v pravokotnem koordinatnem sistemu z računalniškim programom *Microsoft Office EXCEL* s funkcijo **PEARSON**.

Vrednosti Pearsonovega koeficienta se nahajajo na intervalu $[-1, 1]$. Na podlagi njegove vrednosti in predznaka pa lahko povemo, kolikšna je moč linearne povezanosti med spremenljivkama x in y . Glede na lestvico jakosti povezanosti, ki vrednosti $r > 0,75$ uvršča v razred, kjer spremenljivke kažejo močno povezanost, lahko rečemo, da so naše vrednosti koeficienta r blizu **[1]**, kar kaže na zelo močno povezanost spremenljivk. Naši izračuni so pokazali, da je pri vseh treh vzorcih koeficient korelacije $r > 0,999$.

Spremenljivko y smo izračunali po enačbi 4:

$$y = a + bx$$

Enačba 4: linearna regresija

y = pričakovana vrednost odvisne spremenljivke

x = neodvisna spremenljivka

a = konstanta na y – osi

b = naklon v regresijskem modelu

linearna regresija vzorec I

$$y = 0,9981x + 0,0021$$

$$r = 0,9998$$

linearna regresija vzorec II

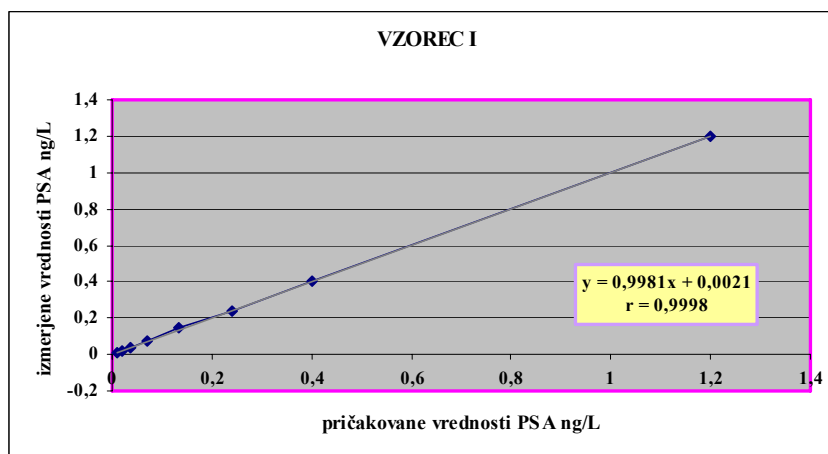
$$y = 0,999x + 0,0155$$

$$r = 0,9996$$

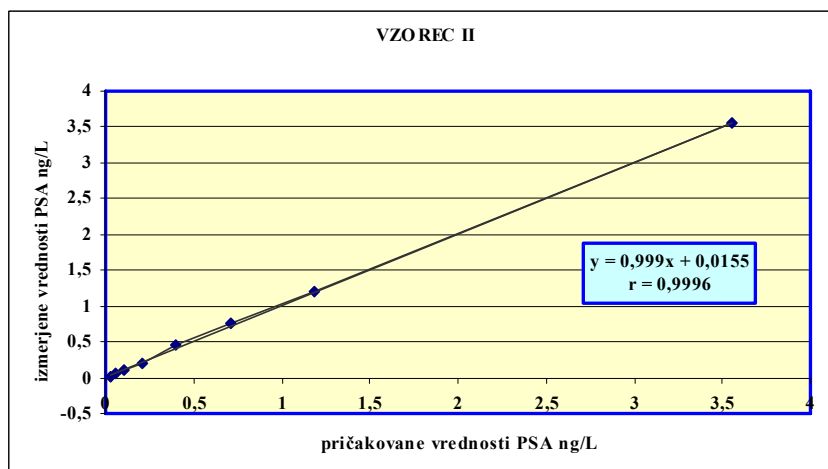
linearna regresija vzorec III

$$y = 0,9966x + 0,2168$$

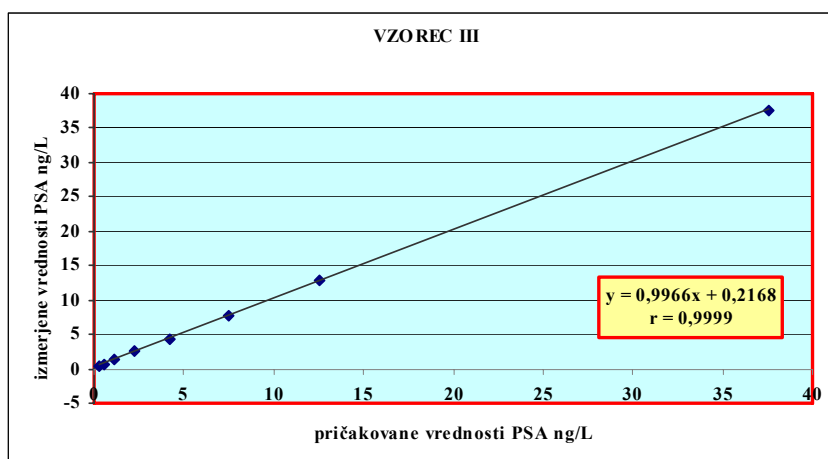
$$r = 0,9999$$



Slika 15: Test linearnosti – vzorec I



Slika 16: Test linearnosti – vzorec II



Slika 17: Test linearnosti – vzorec III

5. SKLEP

Elektroluminiscenčna imunokemijska metoda se je pokazala kot dober izbor za določanje PSA v našem laboratoriju. Na imunokemijskem analizatorju Elecsys 2010, proizvajalca Roche Diagnostics v dokaj kratkem času (analiza poteka osemnajst minut) dobimo zanesljive rezultate, kar smo potrdili z verifikacijo metode.

Z meddnevno ponovljivostjo šestdesetih vzorcev izven serije smo dosegli največjo homogenost rezultatov prvi dan, kar nam pokaže KV z vrednostjo 0,154 %. Rezultati statistične zanesljivosti meritev so pokazali, da je koeficient zanesljivosti znotraj seta 0,995. Ugotovimo, da v našem laboratoriju dosegamo najbolj zanesljive rezultate PSA v serumu, če vzorce analiziramo najkasneje 24 ur po odvzemu ali serume zamrznemo pri -20 °C ali pri nižjih temperaturah, kar se sklada s priporočili NACB in EGTM.

Variabilnost ponovitev v seriji, znotraj ponovitev enega dneva je homogena. Dobili smo tudi visoko vrednost skladnosti ponovitev v enem dnevu $p = 1,000$. Ugotovili smo, da ne obstajajo statistično značilne razlike pri določanju PSA v serumu med ponovitvami po dnevih – ANOVA: $p > 0,05$. Pri testiranju razlik med rezultati istega vzorca po dnevih ugotovimo statistično značilne razlike, povprečni rezultati istega vzorca so različni od dneva do dneva. Za doseganje največje natančnosti, bomo vzorce analizirali v istem časovnem območju, kot smo ga uporabili pri doseganju zanesljivosti rezultatov. To ugotovitev potrjuje skladnost rezultatov ponovitev vzorcev v enem dnevu, ki znaša 0,995. Dokazali smo, da je naš meritveni postopek zanesljiv.

Dokazali smo tudi, da je naša izbrana metoda točna. S testiranjem značilnosti razlik med eksperimentalnimi in teoretičnimi vrednostmi z uporabo razmerja obetov smo ugotovili, da se izmerjene vrednosti statistično neznailno razlikujejo od pričakovanih vrednosti, če izmerjenemu vzorcu dodajamo znano koncentracijo PSA.

Pri ugotavljanju linearnosti analize metode so rezultati testa pokazali zelo močno linearno povezanost spremenljivk. Paersonov koeficient korelacije je bil pri vseh treh vzorcih $r > 0,999$. V raziskavi, ki so jo izvedli na UCLA medicinskem centru v Združenih Državah Amerike pri dokazovanju linearnosti za PSA na imunokemijskem analizatorju Elecsys 2010, so dobili tudi visok koeficient korelacije $r = 0,993$ (41). Zaključimo, da je naša izbrana metoda zmožna v določenem območju dajati rezultate, ki so linearno odvisni od koncentracije PSA v vzorcu.

6. PRILOGA REZULTATI

Preglednica IV: Natančnost metode – Prikaz rezultatov ponovljivosti izven serije za šestdeset vzorcev (n). Statistična obdelava rezultatov Me =mediana µg/L, $\bar{X}$ =aritmetična sredina µg/L, KV =koeficient variacije %, SD =standardna deviacija µg/L.

n=	PSA µg/L prvi dan	PSA µg/L drugi dan	PSA µg/L tretji dan
1.	0,2480	0,2310	0,2720
2.	0,1270	0,1270	0,1460
3.	2,8000	2,7100	3,1100
4.	0,7360	0,7110	0,8170
5.	3,4200	3,2000	3,8600
6.	0,6960	0,6600	0,7920
7.	2,9100	2,7900	3,1400
8.	0,6740	0,6540	0,7810
9.	2,0600	1,9800	2,4100
10.	0,5570	0,4990	0,5790
11.	1,5100	1,5000	1,7500
12.	3,0000	2,8600	3,3400
13.	1,1600	0,9980	1,1300
14.	2,9000	2,6700	3,2600
15.	1,8000	1,7000	2,0100
16.	0,7210	0,6470	0,7660
17.	0,1210	0,1170	0,1370
18.	2,5900	2,4600	2,9000
19.	0,5660	0,5030	0,5870
20.	0,5490	0,5190	0,6120
21.	0,3670	0,3470	0,4030
22.	2,5400	2,5300	3,0000
23.	0,8940	0,8660	1,0200
24.	1,3900	1,3700	1,6600
25.	0,0560	0,0530	0,1390
26.	1,4500	1,3900	1,6600
27.	0,1490	0,1450	0,1720
28.	1,0900	1,1200	1,2800
29.	1,8300	1,7600	2,1200
30.	0,6830	0,6600	0,7850
31.	1,3300	1,2900	1,5000
32.	0,9040	0,8780	1,0900
33.	4,3700	4,3600	5,1300
34.	2,6400	2,5800	3,0000
35.	0,1460	0,1410	0,1550
36.	1,0200	0,9760	1,1300
37.	0,9820	0,9290	1,1300
38.	1,0400	0,9720	1,1500
39.	0,7970	0,7130	0,8300
40.	0,2990	0,2810	0,3340
41.	0,4300	0,4080	0,4940
42.	2,0100	1,9700	2,2800
43.	0,9590	0,8890	1,0800

44.	0,7900	0,7660	0,9160
45.	0,1600	0,1390	0,1930
46.	0,5360	0,4990	0,5780
47.	0,6520	0,5820	0,6920
48.	0,4190	0,3810	0,4510
49.	0,8850	0,8040	0,9770
50.	0,7450	0,7030	0,8200
51.	2,1100	1,8400	2,1200
52.	3,0500	2,8000	3,3100
53.	4,0700	3,7700	4,4000
54.	0,4660	0,4040	0,4740
55.	10,1900	9,0800	10,7000
56.	3,7000	3,3400	4,0300
57.	1,0200	0,9490	1,1200
58.	0,8990	0,8570	1,0200
59.	1,6800	1,5400	1,8000
60.	0,8670	0,7770	0,9100
	prvi dan	drugi dan	tretji dan
Me	0,9315	0,8835	1,0850
$\bar{X}$	1,4793	1,3899	1,6409
KV	1,0611	1,0346	1,0319
SD	1,5698	1,4380	1,6932

Preglednica IX: Natančnost metode – ponovljivost treh vzorcev v seriji v treh zaporednih dneh. Statistična obdelava rezultatov Me =mediana µg/L, $\bar{X}$ =aritmetična sredina µg/L, KV = koeficient variacije %, SD =standardna deviacija µg/L.

Vzorec št. 1

n=	PSA µg/L prvi dan	n=	PSA µg/L drugi dan	n=	PSA µg/L tretji dan
1	0,0560	1	0,0700	1	0,0770
2	0,0550	2	0,0710	2	0,0720
3	0,0570	3	0,0700	3	0,0770
4	0,0570	4	0,0700	4	0,0760
5	0,0580	5	0,0710	5	0,0750
6	0,0540	6	0,0700	6	0,0760
7	0,0550	7	0,0700	7	0,0770
8	0,0520	8	0,0680	8	0,0770
9	0,0550	9	0,0630	9	0,0750
10	0,0550	10	0,0670	10	0,0720
	prvi dan	drugi dan	tretji dan		
Me	0,0550	0,0700	0,0760		
$\bar{X}$	0,0554	0,0690	0,0754		
KV	0,0309	0,0355	0,0259		
SD	0,0017	0,0024	0,0020		

Vzorec št. 2

<i>n</i> =	PSA µg/L prvi dan	<i>n</i> =	PSA µg/L drugi dan	<i>n</i> =	PSA µg/L tretji dan
1	1,9800	1	2,3500	1	2,3300
2	1,9600	2	2,3200	2	2,3400
3	1,9300	3	2,2900	3	2,3500
4	1,9900	4	2,3000	4	2,3900
5	2,0000	5	2,3500	5	2,3400
6	2,0000	6	2,3500	6	2,2800
7	2,0000	7	2,3100	7	2,3100
8	2,0000	8	2,3500	8	2,3300
9	1,9500	9	2,3200	9	2,3100
10	1,9600	10	2,2700	10	2,2700
	prvi dan	drugi dan	tretji dan		
<i>Me</i>	1,9850	2,3200	2,3300		
$\bar{X}$	1,9770	2,3210	2,3250		
<i>KV</i>	0,0129	0,0124	0,0149		
<i>SD</i>	0,0254	0,0288	0,0347		

Vzorec št. 3

<i>n</i> =	PSA µg/L prvi dan	<i>n</i> =	PSA µg/L drugi dan	<i>n</i> =	PSA µg/L tretji dan
1	9,2700	1	10,8600	1	10,7900
2	9,4000	2	11,1100	2	11,1900
3	9,2700	3	11,1400	3	10,8700
4	9,2700	4	11,0400	4	10,9700
5	9,3000	5	10,9000	5	10,8600
6	9,3000	6	11,0500	6	10,8100
7	9,2600	7	10,9300	7	10,9600
8	9,3600	8	11,0600	8	10,6500
9	9,2400	9	10,9900	9	10,9300
10	9,3100	10	10,9500	10	10,6800
	prvi dan	drugi dan	tretji dan		
<i>Me</i>	9,2850	11,0150	10,8650		
$\bar{X}$	9,2980	11,0030	10,8710		
<i>KV</i>	0,0053	0,0084	0,0143		
<i>SD</i>	0,0489	0,0921	0,1559		

7. LITERATURA

1. Kobe V, Dekleva A, Lenart I F, Širca A, Velepič M: Anatomija, 4 zvezek, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 1992:113.
2. Milford Ward A, Catto JWF, Hamdy FC: Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 633-651.
3. Krmpotić Nemanić J: Anatomija čovjeka, Jugoslavenska medicinska naklada, Zagreb 3-1976.
4. Pocajt M, Širca A: Anatomija in fiziologija, DZS Ljubljana, 1990 : 226.
5. Mašera A, Ovčak Z: Patohistološka diagnostika karcinoma prostate, Urološka sekcija SZD in Urološka klinika, Klinični center Ljubljana na 1. slovenskem urološkem simpoziju, maj 1995.
6. Žumer Pregelj M, Sedmak B: Transrektalni ultrazvočni pregled prostate in ultrazvočno vodena biopsija, Urološka sekcija SZD in Urološka klinika, Klinični center Ljubljana na 1. slovenskem urološkem simpoziju, maj 1995.
7. Bren A: Bakterijske okužbe sečil, v Kocijančič A, Mrevlje F (ur.): Interna medicina, DZS Ljubljana 2000; 759, 760
8. Tršinar B: Rezultati zdravljenja benigne prostatične obstrukcije s finasteridom, Strokovni prispevek ZDRAV VESTN 2001; 70: 733-6.
9. Židanik S: Obravnava bolnikov z benigno hiperplazijo prostate BHP pri zdravnikih splošne medicine, Strokovni prispevek ZDRAV VESTN 2003; 72: 411-5.
10. Pompe Kirn V: Epidemiološke značilnosti raka prostate v Sloveniji, Urološka sekcija SZD in Urološka klinika, Klinični center Ljubljana na 1. slovenskem urološkem simpoziju, maj 1995.
11. Janež J: Tumorji na sečilih, v Kocijančič A, Mrevlje F (ur) Interna medicina, DZS Ljubljana 2000; 833.
12. Lovšin M: Sodobna diagnostika raka prostate, *Onkologija /za prakso*, leto X / št. 1/junij2006.
13. The National Academy of Clinical Biochemistry NABC: Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic, Volume 15/2002; 20-25.
14. Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA: Pathology of carcinoma of the prostate. *Cancer* 1992; 70: 235-53.
15. Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CC: Prostatic carcinoma: Problems in the interpretation of prostatic biopsies, *Hum Pathol* 1992; 23: 223-41.

16. Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA: Histopathology of prostate cancer. In: Lepor H, Lawson PK eds. Prostate diseases. Philadelphia London, Toronto: W.B. Saunders Company, 1993: 229-56.
17. Hedrick L, Epstein JI: Use of keratin 903 as an adjunct in the diagnosis of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1989; 13: 389-96.
18. Novaković S: Pregled pomembnejših tumorskih označevalcev v klinični onkologiji, Ljubljana; Onkološki inštitut, 2000 ISBN 961-6071-26-2.
19. Majkić Singh N: Encimi kao tumorski markeri, *Jugoslov Med Biohem* 2006; 25 (2):127.
20. Oblak C: Prostatični specifični antigen, *Onkologija za prakso*, leto X / št. 1 / junij 2006.
21. 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.
22. Novaković S: Tumorski označevalci v klinični onkologiji, *Onkologija pregledi*.
23. Lalić N: Značaj primene standardizovanog postupka za određivanje PSA, *Jugoslov Med Biohem* 2006; 25 (2): 137-141.
24. Lilja H: Structure, function and regulation of the enzyme activity of prostate specific antigen, *World J Urol.* 1993; 11 (4) : 188-91.
25. Peehl DM: Prostate specific antigen role and function, 1995; 75 : 2021-2026.
26. Hajdinjak T, Zagradišnik B, Kokalj Vokač N, Kisner K: Genetski dejavniki in rak prostate (Vpliv polimorfizmov C825T v genu GNB3 in D85Y v genu UGT2B15), strokovni prispevek *ZDRAV VESTN* 2004; 73: 481-4.
27. Zhao XY, Ly LH, Peehl DM, Feldman D: 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 actions in LNCaP human prostate cancer cells are androgen-dependent.
28. Cohen P, Graves HC, Peel DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG: Prostate specific antigen is an insulin like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma, *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1046-53.
29. Popović V: Hormon rasta i somatomedinska hipoteza 2001.
30. Osredkar J: Metode za določanje PSA, Urološka sekcija SZD in Urološka klinika, Klinični center Ljubljana na 1. slovenskem urološkem simpoziju, maj 1995.
31. Lalić N, Aćimović M, Majkić Singh N, Mićić S: Uloga prostatičnog specifičnog antigena u ranoj diagnozi karcinoma prostate, *Jugoslov Med Biohem* 22: 283-288, 2003.
32. Preden Kereković V, Zeljko Ž, Milevoj L: Dijagnostička vrednost udjela slobodnog PSA u diferencialnoj dijagnozi oboljenja prostate, *Biochemia Medica* 11, 3-4, 2001.
33. Zisman A, Soffer Y, Siegel YI, Paz A, Linder A. Post ejaculation serum prostate specific antigen level. *Eur Urol* 1997; 32: 54 7.

34. Herchman JD, Smith DS, Catalona WJ. Effect of ejaculation on serum total and free prostate specific antigen concentration Urology 1997; 50: 239-43.
35. Brawer MK, Meyer GE, Letran JL: Measurement of complexed PSA improves specificity for early detection of prostate cancer. Urology 1998; 52: 372.
36. Mitchell ID, Croal BL, Dickie A: A prospective study to evaluate the role of complexed prostate specific antigen and free/total prostate specific antigen ratio for the diagnosis of prostate cancer. J Urol 2001; 165: 1549.
37. Filella X, Alcover J, Molina R: Measurement of complexed PSA in the differential diagnosis between prostate cancer and benign prostate hyperplasia. Prostate 2000; 42: 181.
38. Stamey TA, Yemoto CE: Examination of the 3 molecular forms of serum prostate specific antigen for distinguishing negative from positive biopsy: relationship to transition zone volume. J Urol 2000; 63: 119.
39. Roche Diagnostics Elecsys ® 2010 Immunoassay System –A4 Format Index V 4,0 Operator's Manual software Version 06.03.
40. ORIGINALNA navodila za kontrole, kalibratorje, PSA reagent, ProCell, CleanCell
41. Butch AW, Crary D, Yee M: Analytical performance of the Roche total and free PSA assays on the Elecsys 2010 immunoanalyzer, Clinical Biochemistry 35 2001 (143-145).