

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**JELKA PEČEK**

**DIPLOMSKA NALOGA  
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE  
BIOMEDICINE**

**Ljubljana, november 2012**



**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**JELKA PEČEK**

**VLOGA INZULINU PODOBNEGA RASTNEGA FAKTORJA  
PROTEINA 3 (IGFBP-3) PRI BOLNIKIHZ RAKOM IN  
BENIGNO HIPERPLAZIJO PROSTATE**

**THE ROLE OF INSULIN-LIKE GROWTH BINDING FACTOR  
PROTEIN- 3 (IGFBP-3) IN PATIENTS WITH PROSTATE CANCER  
AND BENIGN HYPERPLASIA PROSTATE**

**Ljubljana, november 2012**

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., za vodenje, svetovanje in strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Še posebno pa se zahvaljujem mojim najdražjim za podporo in sinu Davidu za potrpežljivost.

## **IZJAVA**

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

Ljubljana, november 2012

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Razdelitev prostate po McNealu .....	2
<b>Slika 2:</b> Analizator LIAISON <sup>®</sup> PSA proizvajalca Dia Sorin.....	20
<b>Slika 3:</b> Reakcija kemiluminiscence.....	23
<b>Slika 4:</b> ELISA .....	31
<b>Slika 5:</b> Porazdelitev IGFBP-3 .....	38
<b>Slika 6:</b> Porazdelitev PSA in In(PSA) .....	39
<b>Slika 7:</b> Boxplot In(PSA).....	40
<b>Slika 8:</b> Odnos med starostjo in razmerjem PSAp/PSA .....	45

## KAZALO TABEL

<b>Tabela I:</b> Patološke spremembe na posameznih delih prostate .....	6
<b>Tabela II:</b> Hybritech Inc; orientacijske vrednosti raka celotnega PSA in PSAp ...	15
<b>Tabela III:</b> Deskriptivne statistike merjenih spremenljivk .....	37
<b>Tabela IV:</b> Rezultat (odvisna spremenljivka IGFBP-3).....	39
<b>Tabela V:</b> Rezultat ANCOVE (odvisna spremenljivka PSA) .....	41
<b>Tabela VI:</b> Rezultat logistične regresije (referenčna skupina bolniki z BHP) .....	42
<b>Tabela VII:</b> Opisne statistike netransformiranih IGFBP-3 po skupinah.....	43
<b>Tabela VIII:</b> Opisne statistike transformiranih IGFBP-3 po skupinah.....	43
<b>Tabela IX:</b> Vrednosti IGFBP-3 glede na vrednost Gleasona .....	44
<b>Tabela X:</b> Razmerje med prostim PSA in celotnim PSA ter pripadnost skupini ...	45

## VSEBINA

1	UVOD .....	1
1.1	FUNKCIONALNA ANATOMIJA PROSTATE .....	1
1.2	BOLEZNI PROSTATE .....	3
1.2.1	BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE (BHP).....	3
1.2.2	PROSTATITIS .....	5
1.2.3	RAK PROSTATE.....	6
1.2.4	KLINIČNE OBLIKE KARCINOMA PROSTATE .....	7
1.2.5	DIFERENCIACIJA KARCINOMA PROSTATE .....	8
1.2.6	OCENA STOPNJE DIFERENCIACIJE PO GLEASONU .....	9
1.2.7	SIMPTOMI IN DIAGNOSTIČNE METODE .....	10
1.3	EPIDEMIOLOGIJA IN DEJAVNIKI TVEGANJA .....	12
1.4	SERUMSKI OZNAČEVALCI KARCINOMA PROSTATE .....	14
1.4.1	PROSTATIČNI SPECIFIČNI ANTIGEN (PSA) .....	14
1.4.2	SPECIFIČNA PROSTATIČNA KISLA FOSFATAZA (SPKF) .....	16
1.4.3	INZULINU PODOBNI RASTNI FAKTORJI IN INZULINU PODOBEN RASTNI FAKTOR VEZNI PROTEIN 3 (IGFBP-3) .....	16
2	NAMEN NALOGE.....	18
3	EKSPERIMENTALNI DEL .....	19
3.1	VZORCI.....	19
3.2	PREDSTAVITEV METODE LIAISON <sup>®</sup> PSA .....	20
3.2.1	PRINCIP METODE .....	21
3.2.2	MATERIALI .....	21
3.2.3	PRIPRAVA REAGENTA .....	22
3.2.4	KALIBRACIJA APARATURE .....	22
3.2.5	OPIS METODE .....	23
3.2.6	POSTOPEK TESTA.....	24
3.2.7	KONTROLA KAKOVOSTI .....	24
3.2.8	IZRAČUN REZULTATOV .....	24
3.2.9	ZNAČILNOSTI METODE .....	24
3.3	PREDSTAVITEV METODE LIAISON <sup>®</sup> fPSA.....	25
3.3.1	PRINCIP METODE LIAISON <sup>®</sup> fPSA.....	25

3.3.3	ZAČILNOSTI METODE	26
3.4	PREDSTAVITEV METODE ZA DOLOČANJE IGFBP-3 ELISA	26
3.4.1	PRINCIP METODE	26
3.4.2	MATERIALI IN REAGENTI	28
3.4.3	PRIPRAVA REAGENTA	29
3.4.4	POSTOPEK TESTA	29
3.4.5	OPIS METODE ELISA	30
3.4.6	INTERNA KONTROLA KAKOVOSTI	31
3.5	STATISTIČNE METODE	32
3.5.1	DESKRIPTIVNA STATISTIKA	32
3.5.2	INTERFERENČNA STATISTIKA	33
4	REZULTATI IN OPIS VZORCA	37
4.1	PSA IN IGFBP-3 TER NJUNA INTERAKCIJA KOT PREDIKTORJI PRIPADNOSTI SKUPINI	41
4.2	PSA PO SKUPINAH IN VREDNOST IGFBP-3	43
4.3	GLEASONOVE VREDNOSTI IN IGFBP-3	44
4.3.1	RAZMERJE MED PROSTIM PSA IN CELOTNIM PSA IN PRIPADNOST SKUPINI	44
5	RAZPRAVA	50
6	SKLEP	53
7	LITERATURA	54
8	PRILOGE	56

## POVZETEK

Prostata je največja akcesorna žleza moških spolovil, velika kot kostanj, ki od vseh strani obdaja uretro. Pri odraslem moškem meri 3 do 4 cm, težka pa je približno 20 g. Po 50. letu starosti se zaradi hormonskih sprememb vnovič poveča in pogosto pride do benigne hiperplazije. Benigna hiperplazija prostate vpliva v glavnem na kakovost odvajanja seča in lahko ob napredovanju pripelje do zapore seča.

S starostjo se povečuje tudi pojavnost raka prostate. Bolezen je običajno prikrita, napreduje počasi in ne povzroča pomembnih težav. Nekateri simptomi pa so podobni kot pri benigni hiperplaziji prostate.

Današnja priporočila veljajo za moške po 50. letu starosti, ki naj bi enkrat na leto opravili preventivni pregled prostate. Ta vključuje digitalni rektalni pregled in določanje nivoja prostatičnega specifičnega antigena. Povišane vrednosti tega proteina so povezane z rakom prostate in tudi z drugimi boleznimi prostate. Metoda določanja nivoja prostatičnega specifičnega antigena je dokaj zanesljiva, njegova specifičnost pa nekoliko slabša, zato je potreba po dodatnem presejalnem testu zelo velika.

Inzulinu podobni rastni faktorji so polipeptidni rastni spodbujevalci, ki vplivajo na celično proliferacijo in metabolne funkcije v različnih organih, tudi v prostati. Serumske vrednosti inzulinu podobnega rastnega faktorja in/ali inzulinu podobnega rastnega faktorja veznega proteina 3 so označevalci za lokalno napredovano bolezen ali metastazirani rak prostate, lahko pa znak za ponovitev bolezni. Raziskave kažejo, da je majhna serumska koncentracija inzulinu podobnega rastnega faktorja veznega proteina 3 povezana z metastazami raka prostate.

Z uvedbo določanja koncentracije inzulinu podobnega rastnega faktorja veznega proteina 3 v serumu pri bolnikih z rakom in benigno hiperplazijo prostate smo želeli ugotoviti, ali bi s tem lahko izboljšali diagnostični postopek in določanje uvedli v rutinsko laboratorijsko prakso. Izsledki analize nakazujejo, da je interakcija med inzulinu podobnim rastnim faktorjem veznega proteina 3 in prostatičnim specifičnim antigenom statistično značilna in lahko pripomore k boljši napovedni vrednosti, vendar je zaradi relativno majhnega števila preiskovancev uporabnost rezultata omejena.



## **ABSTRACT**

The prostate gland is the largest ancillary male genitalia, the size of chestnuts, which surrounds the urethra. The gland in the adult man is 3 to 4 cm long and weighs approximately 20 g. After the age of 50 years the gland start grow again due to hormonal changes and frequently leads to benign prostatic hyperplasia. Benign prostatic hyperplasia affects mainly the quality of urine production and may advance the urine obstruction.

The incidence of prostate cancer is also increased with age. The disease is usually hidden, progressing slowly and does not cause significant problems. Some symptoms are similar to those of a benign prostatic hyperplasia.

According to the present recommendations, men over 50 years of age should undergo preventive annual prostate examination, including digital rectal examination and determination of the level of prostate specific antigen. Elevated levels of this protein are associated with prostate cancer as well as with other prostate diseases. Method of determining the level of prostate-specific antigen is fairly reliable, but its specifics is less reliable; therefore additional screening test is necessary.

Insulin-like growth factors are polypeptide growth promoters, affecting cell proliferation and metabolic functions in different organs, including the prostate. Insulin-like growth factor and or insulin-like growth factor binding protein - 3 in the serum are the markers of the locally advanced disease or metastatic prostate cancer, but may also be the indicators of the reappearance of the disease. Research data show that low serum insulin-like growth factor binding protein – 3 is associated with metastasis of prostate cancer.

By introducing the concentration of insulin-like growth factor binding protein-3 levels to patients with cancer and benign prostatic hyperplasia, we wanted to determine whether this could improve the diagnostic process and establish a routine laboratory testing. The results of the analysis suggest that the interaction between insulin-like growth factor binding protein - 3 and prostate specific antigen is statistically significant and may contribute to a better prognostic value, however the mall number of subjects limits the applicability of the result.

## SEZNAM KRATIC

Ab	protitelo
ACT	$\alpha$ 1-kimotripsin
BP	vezni protein
BHP	benigna hiperplazija prostate
cPSA	vezni prostatični specifični antigen
DHT	dihidrotosteron
ELISA	encimskoimunski test
fPSA	prosti prostatični specifični antigen
G	Gleasonova lestvica
ID	identifikacijska oznaka
IGF	rastni faktor
IGFBP	na proteine vezani inzulinu podobni rastni faktor
MAb	monoklonska protitelesa
PIN	prostatična intraepitelijska neoplazija
HRP	hrenova peroksidaza
PSA	prostatični specifični antigen
PSAp	prosti prostatični specifični antigen
PSA–ACT	prostatični specifični antigen v kompleksu z $\alpha$ 1-antikimotripsinom
SD	standardna deviacija
TRUZ	transrektalni ultrazvok

# 1 UVOD

Prostata je največja akcesorna žleza moških spolovil, ki ima obliko in velikost navadnega kostanja in od vseh strani obdaja uretro. Ob rojstvu tehta le nekaj gramov, povečevati se začne v puberteti pod vplivom androgenih hormonov in neha rasti približno pri 20 letih. Pri moškem srednjih let meri v premeru 3 do 4 cm, težka pa je približno 20 g.

Pri večini moških se začne prostata ponovno večati po 50. letu starosti. (1)

Prostata leži poševno v mali medenici med simfizo in rektumom, z bazo obdaja vrat sečnega mehurja, z vrhom pa leži na urogenitalni preponi. Sestoji iz 20 do 50 razvejenih tubuloalveolarnih žlez, ki se s 16 do 32 izvodili odpirajo na zadnji strani sečnice. (2) Večina semenske tekočine, v kateri se gibljejo spermiji, izvira iz prostate, le manjši del iz semenjaka. Nekaj sekreta prihaja v uretro še iz dveh bulbouretralnih žlez (Cowperjevih žlez), ki ležita ob prehodu uretre skozi mišično medenično dno.

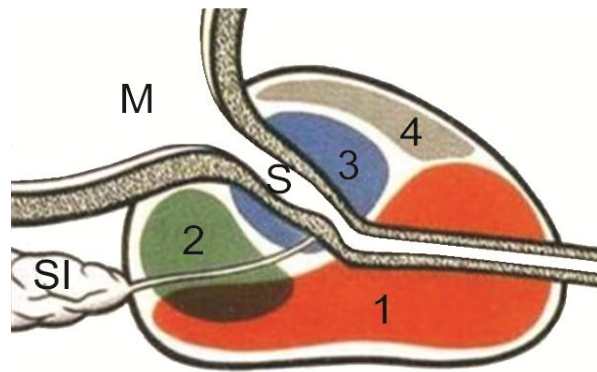
## 1.1 FUNKCIONALNA ANATOMIJA PROSTATE

Prostato sestavljata dva glavna dela: notranji, ki prideluje izločke, ki sluznico sečnice ohranjajo vlažno, in zunanji, ki prideluje semenske izločke. (1) Sodobne poglede na notranjo zgradbo je utemeljil McNeal. (2, 3) Prostata obdaja sečnico v vsej njeni dolžini od vratu mehurja do urogenitalne prepone. Približno na sredini te poti je na zadnji steni sečnice izboklina – verumontanum, na vrhu katere se izteka ejakulatorna voda. Distalno od verumontanuma poteka sečnica navpično, proksimalno pa se nagne pod kot  $35^\circ$  proti mehurju. Žlezno tkivo zajema 66 %, vezivnomišična stroma pa 33 % celotne žleze. McNeal je prostato razdelil na tri dele: centralnega, perifernega in preprostatičnega, ki je dodatno razdeljen na periuretralnega in prehodnega. (3, 4)

**Centralni del** Obsega okoli 25 % žlezne mase prostate, izvodilca žlez se odpirajo tik ob ustjih ejakulatornih vodov, žleze pa se večjijo proksimalno in lateralno ob obeh vodih.

**Periferni del** Izvodilca žlez tega dela se razvijajo iz urogenitalnega sinusa in se odpirajo na lateralni in zadnji steni sečnice, distalno od verumontanuma, žleze pa se večjijo lateralno in distalno. Ta predel zajema več kot 70 % vsega žleznega tkiva prostate. Od izstopa iz mehurja do verumontanuma obdaja sečnico čvrsta vezivna ovojnica, ki je del notranjega sfinktra mehurja.

**Prehodni del** Zajema 5 % celotne žleze in sestoji iz dveh manjših režnjev v sredini prostate.



1 = periferni del, 2 = centralni del, 3 = prehodni del, 4 = anteriorni fibromuskularni del

M = mehur, S = sečevod, SI = semenska izvodila

**Slika 1:** Razdelitev prostate po McNealu

Razdelitev prostate na tri dele ima velik pomen pri anatomski opredelitvi najpogostejših patoloških dogajanj. Za patologijo je pomembno, da se karcinom prostate najpogosteje pojavi v perifernem delu, benigna hiperplazija pa prizadene prehodni segment in v manjši meri tudi periuretralne žleze. (3, 4)

Žleza prostata je oživčena prek avtonomnega živčnega sistema, in sicer prek parasimpatičnih (holinergičnih) in simpatičnih (noradrenergičnih) živcev. (3) To je del prostatičnega živčnega pleteža, ki leži tik ob prostati. Medenični pletež oživčujejo parasimpatični živci, ki izhajajo iz sakralnega dela hrbtenjače (S4–5), simpatično nitje pa izhaja iz hipogastričnega presakralnega nevrona (T11-L2). (3) Avtonomni živci izhajajo iz medeničnega pleteža in ščitijo vaskularno prožnost. Tako oba, holinergično kot noradrenergično nitje, oživčujeta prostatično stromo. Holinergični živci oživčujejo tudi gladke mišice ovojnice in področje okrog krvnih žil in so odgovorni za izločanje iz epitelnega dela. Simpatični živci nadzorujejo prostatično muskulaturo med ejakulacijo semenske tekočine. Med ejakulacijo se semenska tekočina s spermiji iz ampule vas deferensa pod vplivom alfaadrenergične stimulacije premakne v zadnjo sečnico. (1, 4)

Ejakulat prostate je mlečna tekočina s pH 6,5, ki vsebuje številne sestavine, med katerimi so najpomembnejše: kislja fosfataza, citrat, cink, topne frakcije proteinov, ogljikovi hidrati, elektroliti, poliamidi, hormoni, lipidi in rastni faktorji. (4)

Odkritih je bilo 57 glavnih skupin proteinov, od katerih je 27 nesorumskih proteinov (verjetno izločenih iz epitelnih celic). Glavni specifični prostatični proteini so prostatična kislja fosfataza (PKF), prostatični specifični antigen (PSA) in prostatični vezni protein, ki se začne izražati v puberteti in v odrasli dobi. Proteoliza je glavna funkcija izločanja prostate, bogate z eksopolipeptidazo in endopolipeptidazo. Najbolj proučevana proteaza je PSA, poznana kot seminin, semenska proteaza ali krimotripsinu podobna proteaza.

## **1.2 BOLEZNI PROSTATE**

Najpogostejše bolezni prostate so:

- benigna hiperplazija prostate (BHP),
- prostatitis,
- karcinom prostate.

### **1.2.1 BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE (BHP)**

BPH je najpogostejše obolenje v celotni urološki patologiji. Osnovna patološka sprememba je povečanje prostate zaradi številnih vozličastih formacij, v katerih so žlezni in/ali stromalni tkivni elementi. (4, 6)

Za bolezen je značilno, da se pojavlja po 50. letu starosti. Njena incidenca z leti strmo narašča in pri starosti 80 let so morfološki znaki prostatične hiperplazije prisotni pri okoli 75 % moških.

Hiperplazija prostate se ne manifestira vedno tudi klinično. Številni primeri se odkrijejo rutinsko pri obdukcijah, na da bi imeli bolniki v življenju zaradi tega kakršnekoli težave. Mnogokrat pa je hiperplazija prostate za bolnika prava nadloga in včasih povzroča tudi resne zaplete. Pri hiperplaziji prostate hiperplazirajo žleze v prehodnih delih prostate okoli notranjega dela, medtem ko žleze v perifernih področjih atrofirajo. (4, 7)

Ravno ta notranji, periuretralni del prostate pa je pod hormonskim vplivom estrogenov. Poenostavljeno si razlagamo nastanek hiperplazije tako, da s starostjo pade nivo androgenov

v organizmu in zato pride do relativnega porasta estrogenov. Ti delujejo na centralni del žleze, ki nato postopoma hiperplazira. (6)

Prostata je povečana dva- do trikrat. Na rezni ploskvi se vidi v centralnem delu vozličče, medtem ko je periferni del prostate stisnjen. Največji vozličči merijo v premeru tudi do 1 cm. Zaradi hiperplastičnih vozliččev je svetlina uretre iregularno zožana. Pogosto je hiperplastična prostata močno cistično spremenjena, z rezne ploskve pa v številnih primerih odteka belkasta, mlečna tekočina.

### ***Znaki benigne hiperplazije prostate (BHP)***

**Iritabilni znaki** Kažejo se kot pogoste in urgentne mikcije, nokturija in disurije. (8)

**Obstruktivni znaki** Običajno je obotavljiv začetek uriniranja, tanek curek, ki se prekinja, kapljanje na koncu in nepopolno praznjenje mehurja ter zastanki več kot 50 ali 100 ml urina. Dolgotrajna obstrukcija povzroči popuščanje mehurja, kroničen zastoj seča, dilatacijo zgornjih sečil, uremijo in trajno ledvično odpoved. Včasih je prvi znak težav pri kroničnem zastojem šele stalno, nehotno uhajanje seča ali ledvična odpoved z uremijo. Stalna odtočna ovira povzroči, da mehur popušča, nastane slab meh, ki se slabo krči. Tako nastanejo divertikli – izbočenja sluznice mehurja, ki kompenzirajo visok pritisk seča v mehurju. V zastalem seču se naredijo sečni kamni, ki vzdržujejo okužbo. Akutna zapora seča se lahko pojavi nenadoma. Sprožilni dejavniki so lahko zdravila z alfaadrenergičnim delovanjem, alkoholne pijače, nizke temperature, vnetja. Bolnik ima močne bolečine, je prizadet, poten. (8)

Ustrezna pomoč je vstavitve urinskega katetra in izpraznitev mehurja.

## **1.2.2 PROSTATITIS**

Vnetje prostate, ki se navadno pojavi pri moških med 30. in 40. letom starosti, imenujemo prostatitis. Vzrok je navadno bakterijska okužba, ki se razširi iz sečnice, lahko pa je tudi posledica glivične okužbe, virusne okužbe ali okužbe s praživalmi. (1, 4)

### ***Akutni bakterijski prostatitis***

Za akutni prostatitis je značilen nepričakovan začetek bolezni, ki se manifestira z nenadno mrzlico ter povišano telesno temperaturo, bolečinami perianalno, v hrbtu in v spodnjem delu trebuha. Pridruženi so še drugi znaki, in sicer disurije, hematurije, pogosta uriniranja in slabo počutje. Vnetje povzroči tudi povečano izločanje prostatičnega specifičnega antigena (PSA) v serumu, ki običajno traja 6 tednov. (4, 8)

### ***Kronični bakterijski prostatitis***

Ocenjuje se, da se bakterijska okužba ugotovi le pri 5 % bolnikov s kroničnim prostatitisom. Patogeneza nastanka je pogosto nejasna. Možne so naslednje poti okužbe: ascendentna okužba, intraprostatični refluks urina, prodor bakterij iz rektuma, limfogena, hematogena. Klinični znaki so nejasni, včasih celo prikriti. Najpogostejši znaki kroničnega prostatitisa so pogostejša vnetja, nekoliko pekoča bolečina pri uriniranju, eno- ali obojestranske bolečine v dimljah, hemospermija in boleče ejakulacije. Kronični prostatitis povzroča tudi motnje sekretorne funkcije žleze. V krvi se lahko pokažejo povišane vrednosti PSA, ki pa se po zdravljenju normalizirajo. (4, 8)

### 1.2.3 RAK PROSTATE

Rak prostate, pogosto imenovan **karcinom**, med vsemi vrstami raka najizraziteje prizadene moške nad 50. letom in predvsem med 70. in 75. letom starosti. (9) To velja za klinično manifestne tumorje, saj mnogi nosilci mikroskopskega karcinoma umrejo v starosti zaradi drugih vzrokov. Incidenca raka prostate v svetu in Sloveniji zadnja desetletja narašča. (10)

Karcinom prostate večinoma raste počasi. Tumor je očitno hormonsko odvisen, saj ga pri kastriranih moških ni, pri bolnikih z jetrno cirozo in posledično hiperestrogenemijo pa se pojavlja bolj pogosto. (13)

Med karcinom prostate in benigno hiperplazijo prostate (BHP) (9) ni vzročne povezave, čeprav večina karcinomov nastane v hiperplastičnih žlezah.

Kar 70 % karcinomov prostate nastane v perifernem delu, 25 % pa v prehodnem, ki je lahko hkrati hiperplastičen. (9) Le 1 do 5 % karcinomov nastane v osrednjem delu prostate (tabela I).

**Tabela I:** Patološke spremembe na posameznih delih prostate

Patološke spremembe	Osrednji del	Prehodni del	Periferni del
<b>benigna hiperplazija</b>	redko	pogosto	Redko
<b>karcinom</b>	redko	pogosto (25 %)	zelo pogosto (75 %)



Karcinom prostate najpogosteje nastane v perifernem delu žleze, in to v posterolateralnem predelu. Makroskopsko nima posebnih značilnosti in se razen v trdoti konsistence le malo razlikuje od normalnega tkiva prostate. Mikroskopsko je v 95 % adenokarcinomov, ki tvorijo atipične mikro- ali makroacinarne žlezne strukture, trabekularne ali kribriformne formacije, lahko pa je sestavljen iz solidnih skupkov tumorskih celic. (9)

Agresivnost oziroma biološki potencial lahko ugotavljamo le na osnovi gradusa, stadija in volumna raka prostate.

Razvitih je bilo več sistemov (stopnja anaplazije), vendar danes uporabljamo le Gleasonov sistem (razvit l. 1974).

Posebna sprememba, ki jo najde patolog, je prostatična intraepitelijska neoplazija (PIN), ki je proliferacija sekrecijskih celic z jedrno anaplazijo. Ni povsem jasno, ali so to predmaligne spremembe ali pa najdbe, v katerih se v bližini razvijajo rakaste celice.

#### 1.2.4 KLINIČNE OBLIKE KARCINOMA PROSTATE

Adenokarcinom prostate se v praksi imenuje kar karcinom prostate. Karcinom prostate je pogosta novotvorba in se lahko pojavi v štirih oblikah, kot klinični, incidentni, latentni in okultni karcinom. (9, 10)

**Klinični karcinom** se ugotovi z rektalno digitalno palpacijo, ki pokaže zatrditev in nepravilno oblikovanost prostate. Povečana koncentracija serumskih označevalcev ter povišana vrednost prostatične kisle fosfataze (SPKF) in prostatičnega specifičnega antigena (PSA) kot tudi pozitivna ultrazvočna preiskava kažejo na možnost kliničnega karcinoma. Diagnoza mora biti vedno potrjena z biopsijo.

**Incidentni karcinom** ugotovi patolog naključno pri pregledu bioptičnega materiala, ko klinik ni sumil, da gre za karcinom. To vrsto karcinoma najdemo v prostatah, ki so bile odstranjene zaradi benigne hiperplazije. V 6 do 20 % hiperplastičnih prostat histološki pogled odkrije karcinom. Incidentni karcinom leži v periuretralnem, prehodnem delu in je najpogosteje dobro diferenciran tumor.

**Latentni karcinom** je brez simptomov in se naključno odkrije pri avtopsiji. Pogostost latentnega karcinoma niha v širokem razponu med 26 in 73 %. Navadno ga najdemo v perifernem delu žleze in je večinoma dobro diferenciran. Ni še znano, zakaj nekateri dobro

diferencirani karcinomi v perifernem delu napredujejo in metastazirajo, nekateri pa ostanejo latentni.

**Okultni karcinom** se najprej pokaže z metastazami v kosteh in bezgavkah, primarni karcinom pa je brez simptomov. Diagnostično si pomagamo z ugotavljanjem serumskega PSA pa tudi z imunohistokemičnim prikazom tega označevalca v tkivu metastaze.

Pozitivni rezultat imunohistokemične preiskave skoraj z gotovostjo govori v prid prostatičnemu izvoru metastaze, negativni pa ga nikakor ne izključuje. Končna diagnoza je postavljena z biopsijo prostate.

### 1.2.5 DIFERENCIACIJA KARCINOMA PROSTATE

Karcinome prostate klasificiramo glede na stopnjo diferenciacije, stopnjo anaplazije in način invazije. (9, 10)

**Dobro diferencirani karcinom** tvori jasne atipične žlezne tvorbe, ki so lahko mikro- in makroacinarne.

**Zmerno diferencirani karcinom** tvorijo manj izrazite žlezne tvorbe, ki se pogosto urejajo v kribriformne formacije.

**Slabo diferenciran karcinom** tvorijo pretežno solidni skupki, trački ali plaže tumorskih celic, ki le ponekod nakazujejo žlezne tvorbe.

**Nediferencirani karcinom** sestavljajo izključno solidni skupki tumorskih celic.

Rak prostate se lahko širi neposredno z lokalnim napredovanjem, to je s povečevanjem volumna, ter z žilno in limfatično invazijo. Lokalno napredovanje lahko zajame semenske mešičke, vrat mehurja in periprostatično maščobno tkivo. Na ta način lahko infiltrira v sečevod in povzroči zaporo zgornjih sečil. Z limfatičnim širjenjem so najprej zajete regionalne bezgavke, nato pa iliakalne in veriga retroperitonealnih bezgavk. Pri žilni invaziji se rak širi po krvi v oddaljene organe, najprej v kosti, pogosto v hrbtenico, rebra, medenico. Zasevki se pojavijo še v pljučih, nadledvičnici, redkeje v jetrih.

Na osnovi širjenja bolezni klinično razlikujemo lokalizirani rak prostate, ko je bolezen omejena na samo žlezo. Pri lokalno napredovalem raku prostate se bolezen širi v okolno tkivo in bezgavke. Napredovali rak prostate se razširi tudi na druge organe.

## 1.2.6 OCENA STOPNJE DIFERENCIACIJE PO GLEASONU

V praksi se za oceno stopnje diferenciacije karcinoma prostate najbolj pogosto uporablja Gleasonov sistem. (5, 10) Temelji predvsem na oceni atipičnosti arhitektonike žleznih struktur tumorja, ne upošteva pa anaplazije tumorskih celic in jeder. Gleason razvršča karcinom v 5 razredov, od katerih so 3., 4. in 5. dodatno razdeljeni v podrazreda A in B. (9) V praktični uporabi je Gleasonov sistem dokaj zapleten in razvrsti heterogeno diferenciranost posameznega tumorja od dobro diferenciranih do popolnoma nediferenciranih predelov. (5, 10)

V praksi je pomembno, da ocenjujemo tumorje s skupno oceno od 2 do 10, pri čemer se šteje:

- do 4 za nizkomaligne,
- od 7 do 10 pa za visokomaligne.

Ocena prognoze pri vmesnih stopnjah še ni docela ovrednotena. Sicer pa je Gleasonov sistem v klinični praksi uporabna in zanesljiva prognostična metoda. Seštevek po Gleasonovi lestvici dobro korelira z odstotkom invazije prek kapsule, v semenske mešičke ali v bezgavke. Višji kot je seštevek, večja je verjetnost, da gre za lokalno napredovali rak prostate. Tako je pri G 5–7 verjetnost penetracije kapsule 32-odstotna, pri G 8 pa 78-odstotna. (7)

## 1.2.7 SIMPTOMI IN DIAGNOSTIČNE METODE

**Simptomi** raka prostate so v začetnem obdobju povsem nemi, kasneje v popolnosti posnemajo simptome obolenja spodnjih sečil kot pri BHP. V napredovalem stadiju se simptomom pridružijo še tisti, ki so posledica zasevkov, predvsem bolečine v kosteh, izguba teže, anemija, ledvična odpoved, utrujenost, otekline na nogah, centralni nevrološki znaki. (11)

**Digitorektalni pregled (DRP)** je najpomembnejši in enostaven diagnostični postopek. Priporoča se, da bi bil sestavni del osnovnega pregleda moškega po 50. letu. Z DRP se opisuje velikost in konsistenco prostate ter morebitne spremembe, kot so zatrdline, asimetrija žleze, v celoti trša ali neravna žleza.

S tem pregledom se otiplje le rak v periferni coni prostate, če pa je prisoten v centralni coni (v 5 %) ali prehodni coni (25 %), se ne otiplje. Rak s tega področja se odkrije pri histološkem pregledu tkiva, po resekciji prostate zaradi begine hipertrofije. Nodusi so čvrsti, kasneje z razrastom raka pa je cela prostata trda, neravna. Tipni nodusi v prostati niso vedno maligni, le pri 50 % gre za raka, pri 50 % se tipljejo prostatični kamni, fibroza, infarkt ali pa gre za vnetje žleze.

**Transrektalna ultrazvočna preiskava (TRUZ)** je diagnostični postopek, pri katerem urolog z ultrazvočno sondo, ki jo vstavi skozi anus v črevo, pregleda prostato ter oceni njeno velikost in spremembe v njej. Pokaže spremenjena mesta in velikost žleze, poleg tega pa omogoča vodeno punkcijo tkiva žleze.

TRUZ omogoča:

- odkrivanje raka,
- oceno razširjenosti raka,
- sledenje uspešnosti zdravljenja.

Pomanjkljivost te preiskave je, da odkrije raka le v periferni coni, zelo nezanesljiva pa je za odkrivanje v prehodni coni in na področjih, ki se kažejo kot izo- ali hiperehogeno področja.

**Biopsija prostate** je potrebna za dokončno postavitev diagnoze raka. Vzorce se odvzame z vzmetno iglo in s transrektalno UZ-vodeno biopsijo. Pod UZ-kontrolo se odvzame od 6 do 12 vzorcev iz celotne žleze – iz vrha, sredine in baze obojestransko. Poseg je izjemno boleč in lahko nastopijo zapleti, kot so povišana temperatura, prostatitis, hematurija, kri na blatu, hemospermija.

**Laboratorijske preiskave** so pomemben del diagnostičnega postopka, med katerimi je najpomembnejše določanje vrednosti PSA v serumu ter določanje raznih izpeljank, kot so gostota PSA, hitrost PSA, prosti in vezani PSA.

### 1.3 EPIDEMIOLOGIJA IN DEJAVNIKI TVEGANJA

Karcinom prostate je danes eden najpomembnejših zdravstvenih problemov moške populacije. V Evropi je rak prostate pri moškem na drugem mestu, takoj za pljučnim rakom. Tudi v Sloveniji podatki kažejo, da narašča število moških, starejših od 70 let, ki obolevajo za rakom prostate. V letih od 1995 do 2000 je število naraslo za četrtno, in sicer z 49.061 na 60.397. Po podatkih Registra raka v Sloveniji je bil v letu 2007 rak prostate najpogostejša diagnosticirana oblika raka pri moških (predstavljal je 24,1 % vseh primerov obolenosti za rakom in 10,4 % smrti zaradi raka pri moških). (12) Natančen vzrok za nastanek raka prostate ni poznan. Podatki kažejo, da je nastanek povezan z nekateri dejavniki tveganja, med katerimi so najpogostejši starost, rak v družinski anamnezi, rasa in nivo androgenov. Opisujejo pa tudi vpliv diete, spolnih navad, okužbe in dejavnike okolja. (4, 13)

**Staranje** je najpomembnejši dejavnik, ki je povezan z razvojem raka prostate. Bolezen se redko pojavlja pri moških, mlajših od 50 let, incidenca bolezni pa se značilno poveča pri starejših od 60 let.

**Družinska anamneza** je pri raku prostate bistvenega pomena. Odkrili so, da so za različno dedno nagnjenost k nastanku raka prostate odgovorni številni nizkopenetrantni geni. Visokopenetrantni geni predstavljajo zelo veliko tveganje za razvoj bolezni, zato so njihove posledice dedne bolezni – družinski rak. Posamezni nizkopenetrantni geni sicer ne povzročajo razvoja bolezni sami zase, so pa pogosti in prispevajo k povečanju tveganja za razvoj bolezni, na primer z modulacijo posameznikovega odziva na vplive kancerogenih dejavnikov okolja, kot so hrana, način življenja itd. Znano je, da je genom ljudi 99,9-odstotno identičen. Genske analize so dognale, da je za to odgovoren gen HPC, točka v genu, ki je dovzetna za mutacije, pa je HPC1, ki leži na dolgem kraku kromosoma 1. Drugi dovzeten lokus pa leži na kromosomu X. Preostali majhen odstotek (0,1 %) dopušča, da se med seboj razlikujemo. Veliko teh razlik se išče v polimorfizmu posameznih nukleotidov.

Dokazano je, da so moški, ki imajo v ožjem družinskem krogu najmanj enega sorodnika s pozitivno diagnozo, 3-krat bolj podvrženi bolezni kot tisti brez anamneze. Ocenjujejo, da je približno 9 % vsega raka prostate povezanega z genetiko.

**Rasa** Incidenca raka prostate med rasnimi skupinami variira. Na nekaterih območjih ZDA je nevarnost obolenosti za to boleznijo pri črncih 80 % večja kot pri belcih. Japonci in Kitajci

imajo najnižjo stopnjo pojavnosti raka prostate. Kljub etničnim in geografskim variacijam pa je bila incidenca asimptomatske bolezni odkrita pri vseh populacijah podobno.

**Dieta** Uživanje mastne hrane in rdečega mesa lahko prav tako korelira s povečanim tveganjem za razvoj raka prostate.

Nasprotno naj bi prehrana z veliko likopena (paradižnik) in rastlinskimi estrogeni (soja, brokoli, cvetača) ter selenom preprečevala nastanek in razvoj bolezni. Prav tako je bilo dokazano, da redno uživanje tokoferola (vitamin E) zmanjša incidenco pojavnosti raka za 34 %. (6)

**Hormoni** Glavni moški spolni hormon testosteron in njegov aktivni metabolit dihidrotestosteron (DHT) sta esencialna za normalno rast žleze prostate, zato igrata pri razvoju raka pomembno vlogo. Pri moških, ki so bili kastrirani pred puberteto, in pri moških z zmanjšanim nivojem 5- $\alpha$ -reduktaze je rak prostate redek. 5- $\alpha$ -reduktaza je encim, ki testosteron pretvori v dihidrotestosteron (DHT). Zvišan nivo tega encima pa je povezan s povečano nevarnostjo za razvoj raka.

**Spolne navade** Obstajajo hipoteze, da je nevarnost za obolenje večja pri moških, ki so zelo zgodaj postali spolno aktivni, in pri tistih, ki imajo več spolnih partnerjev ali pa spolno prenosljivo bolezen.

**Vplivi okolja** Izpostavljenost industrijskim kemikalijam (npr. kadmiju) ali sevanju. Večja nevarnost je tudi za kmete, ki so izpostavljeni gnojilom ali kemikalijam za zatiranje škodljivcev.

**Okužbe** Virus herpes simpleks tipa 2 (genitalni herpes) poveča pojavnost raka prostate.

## 1.4 SERUMSKI OZNAČEVALCI KARCINOMA PROSTATE

Med najbolj preiskovane označevalce (markerje) raka prostate prav gotovo spada določanje PSA, ki je del rutinskega diagnostičnega postopka. Metoda določanja vrednosti PSA v serumu je dokaj zanesljiva, ni pa dovolj selektivna in specifična. Glede na nova spoznanja se pojavljajo novi označevalci, za katere se predvideva, da bodo prispevali k odgovoru na številna diagnostična in terapevtska vprašanja pri različnih boleznih, tudi pri karcinomu prostate.

Najpomembnejši serumski označevalci karcinoma prostate so:

- prostatični specifični antigen (PSA),
- specifična prostatična kislina fosfataza (SPKF),
- drugi označevalci, kot so inzulinu podoben rastni faktor 1 (IGF-1) in inzulinu podoben rastni faktor vezni protein 3 (IGFBP-3), kromogranin A(CgA).

### 1.4.1 PROSTATIČNI SPECIFIČNI ANTIGEN (PSA)

PSA je glikoprotein z molekulsko maso 35.000 daltonov in je iz družine serinskih proteaz. (13, 14) Izločajo ga epitelne celice prostate in parauretralne žleze. PSA izvaja biološko funkcijo pri utekočinjenju semena. Praktično merljivo količino PSA v serumu prispevajo celice prostate – tako benigne kot maligne, zato je PSA tkivno in ne tumorsko specifičen označevalec. (14, 15) Serumsko koncentracija PSA narašča s starostjo, kot se pojavlja benigna hiperplazija prostate. S tem ko se poveča koncentracija PSA, se poveča tudi verjetnost prisotnosti raka prostate, vendar jasne razmejitve ni. Tako je pri moškem, starem 50 let, ocenjena verjetnost, da se odkrije rak prostate, ki ga po današnjih merilih ocenjujemo kot klinično pomembnega pri vrednosti PSA 3  $\mu\text{g/l}$ , približno 20-odstotna. (15) V območju med 4 in 10  $\mu\text{g/l}$  je verjetnost približno 35-odstotna, z naraščanjem PSA pa se zelo hitro povečuje. Tudi pri vrednostih pod 2,5  $\mu\text{g/l}$  je lahko prisoten klinično pomemben rak prostate. (13, 15)

V serumu je antigen prisoten v dveh oblikah, večinoma kot vezani (v 60–90 %) in v manjši meri kot prosti PSA (v 10–40 %), v semenski tekočini pa prevladuje prosta oblika. (16) Navadno določamo vrednost celotnega PSA in prostega PSA (PSAp). Porušenje normalne žlezne celične zgradbe povzroči povečano izločanje v serumu. (7)



PSA je najboljši serumski označevalec za raka, ni pa idealen. Podatki kažejo, da je njegova občutljivost med 79 in 82 %; če je volumen raka večji kot 1 ml, je občutljivost testa okrog 90-odstotna. (13) Njegova specifičnost pa je slabša, samo 59-odstotna. (7, 13) Zaradi tega so bili uvedeni novi parametri, ki imajo večjo napovedno vrednost. (13)

**Prosti PSA (PSAp)** predvsem izboljša odkrivanje raka pri skupinah z dejavniki tveganja. Upoštevanje vrednosti prostega PSA je bolj izboljšalo občutljivost testa kot upoštevanje starosti moških.

**Gostota PSA (PSA density)** izboljša napovedno vrednost zunaj prostatične rasti pri lokalno omejenem karcinomu, hkrati je napovedni dejavnik napredovanja bolezni po radikalni prostatektomiji.

**Gostota PSA prehodne cone** je izpeljava gostote PSA. S transrektalnim ultrazvokom izmerimo prostornino prehodne cone in določimo vrednost celotnega serumskega PSA:

- podvojitveni čas PSA,
- razmerje med prostim in celotnim PSA.

Prosti PSA se uporablja za izračun razmerja prostega PSA v primerjavi s celotnim PSA. Rezultat PSAp je ravno obraten od celotnega – višji, kot je PSAp, manjše je tveganje za raka. Nižji PSAp pomeni nižje razmerje, zlasti pri vrednostih pod 10 % pa bi z večjo verjetnostjo lahko šlo za raka. Uporaba razmerja je bila proučevana predvsem pri PSA med 4 in 10 (ne pri nižjih vrednostih). (13)

**Tabela II:** Hybritech Inc; orientacijske vrednosti raka celotnega PSA in PSAp

Vrednost PSA	Verjetnost karcinoma	Prosti PSA (%)	Verjetnost karcinoma
0–2 µg/l	1 %	0–10 %	56 %
2–4 µg/l	15 %	10–15 %	28 %
4–10 µg/l	25 %	15–20 %	20 %
> 10 µg/l	> 50 %	20–15 %	16 %
		> 25 %	< 8 %

Z različnimi imunodetekcijskimi metodami so uspeli dokazati PSA v serumu (14), posebno pa je pomemben podatek, da se koncentracija PSA poveča pri bolnikih s karcinomom prostate. Ta pojav je posebno izrazit pri bolnikih z lokalno napredovalo boleznijo oziroma z metastazami.

#### **1.4.2 SPECIFIČNA PROSTATIČNA KISLA FOSFATAZA (SPKF)**

Specifična prostatična kislina fosfataza (SPKF) je encim, odkrit leta 1924 v eritrocitih. Leta 1938 je Gutman odkril kislino fosfatazo v serumu in povečano aktivnost encima na mestu kostne metastaze karcinoma prostate. (18) Aktivnost encima kislne fosfataze je največja v žlezem epiteliju prostate, najdemo pa jo lahko tudi pri raku dojke, želodca, kolona, pri multiplnem mielomu, levkemijah, osteosarkomu, hepatitisu in cirozi. (7, 18)

#### **1.4.3 INZULINU PODOBNI RASTNI FAKTORJI IN INZULINU PODOBEN RASTNI FAKTOR VEZNI PROTEIN 3 (IGFBP-3)**

Inzulinu podobni rastni faktorji (IGF) so polipeptidni rastni spodbujevalci. (19) Poleg tega da so prisotni v obtoku, jih številna tkiva sintetizirajo tudi lokalno. PSA je serinska proteaza, ki je tesno povezana z inzulinu podobnim rastnim faktorjem 1 (IGF-1) in IGF veznim proteinom 3 (IGFBP-3). Zaradi te povezave se zmanjša njegova afiniteta do IGF-1. Peptidni rastni faktorji so vplivni regulatorji celične proliferacije in metabolnih funkcij. Skupina IGF so močne mitogene in antiapoptotične molekule, vključene v regulacijo celične proliferacije in diferenciacijo v različnih organih, tudi v prostati. (19, 20)

Intraprostatično izražena IGF-1 in IGFBP-3 sta povezana s tumorjem žleze, patološkim nivojem in napredovanjem bolezni. IGF-1 se sintetizira v številnih tkivih in spodbuja rast obeh celic, tako benignih kot malignih. IGF-1 domnevno deluje kot avtokrini ali parakrini rastni dejavnik za različne maligne celice, vključno z rakavimi celicami prostate. (21)

Prostatični specifični antigen (PSA) se lahko poveže z IGFBP-3. S tem se zmanjša njegova afiniteta za IGF-1. (19, 20, 21) IGF-1 omogoča vezavo na njegove membranske receptorje, pri benigni hiperplastični prostati (BHP) pa na epitelne celice. (21)

Stromalne celice prostate proizvajajo IGF in IGFBP-3. Eksogeni PSA lahko proteolizira kompleks celične strome IGF-1-IGFBP-3 s proizvajanjem navideznega neposrednega stimulacijskega odziva. Čeprav kompleks IGF-1-IGFBP-3 se povrne, IGF-1 ima za vezavo

proste receptorje in spodbuja celično proliferacijo. Ugotavlja se možnost učinkov prilagajanja PSA z IGF-1 in IGFBP-3 pri razraščanju BHP. (22)

V družino IGF spada šest visokoafinitetnih veznih proteinov. (24) Ti spadajo med sorodne proteine IGFBP-3 in so del proteinov, bogatih s cisteinom, z ohranjeno terminalno amino skupino ter terminalno karboksilnim delom cDNK na zaporedju dozorelega IGFBP peptida na CD 33. IGFBP-3 je največji vezni protein IGF v trojnem kompleksu skupaj z IGF 1 ali IGF 2. Inzulinu podobni rastni faktorji in IGF 1 igrajo pomembno vlogo pri celični rasti in so diferenciacijski dejavniki v serumu, ki so odgovorni za visoke serumske celice, celična linija prostatičnega karcinoma. (24) Serumske vrednosti IGF-1 in/ali IGFBP-3 so označevalci za lokalizirano napredovalo bolezen ali metastazirani rak prostate, lahko pa tudi znak ponovitve bolezni. Raziskave kažejo, da je majhna serumska koncentracija IGFBP-3 povezana z metastazami raka prostate in da je neodvisni kazalec biokemičnega napredovanja po operaciji za lokalizirano bolezen prostate. (19–25)

## **2 NAMEN NALOGE**

Metoda določanja PSA je dokaj zanesljiva, vendar pa ni dovolj selektivna in specifična, kajti povišane vrednosti najdemo pri raku prostate, benigni hiperplaziji prostate in vnetju prostate. Zaradi slabe specifičnosti postopka so potrebe po dodatnem presejalnem testu velike.

V okviru diplomske naloge bomo pri skupini bolnikov z diagnozo rak prostate oziroma benigna hiperplazija prostate (BHP) poleg standardne koncentracije prostatičnega specifičnega antigena (PSA) in proste frakcije PSA določili tudi IGFBP-3 v serumu. Bolnike bomo glede na določeno koncentracijo PSA razdelili v dve skupini. Na osnovi določitve IGFBP-3 bomo poskušali ugotoviti, ali določitev IGFBP-3 prispeva k boljši diagnostiki raka prostate in ali na osnovi teh rezultatov lahko ločimo bolnike z rakom prostate od bolnikov z benigno hiperplazijo prostate.

### **3 EKSPERIMENTALNI DEL**

Laboratorijski del raziskave je potekal na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra.

Posamezne vrednosti v vzorcih smo določali na naslednjih analizatorjih:

- PSA z analizatorjem LIAISON® PSA proizvajalca Dia Sorin,
- prosti PSA z analizatorjem LIAISON® fPSA proizvajalca Byk – Sangatec Diagnostica,
- IGFBP-3 z analizatorjem IBL, IGFBP-3 ELISA.

Rezultate smo nato statistično obdelali.

#### **3.1 VZORCI**

V raziskavo je bilo od februarja do konca junija 2012 vključenih 79 bolnikov, starih od 55 do 81 let, ki so bili na Urološki oddelek Univerzitetnega kliničnega centra napoteni zaradi težav s prostato in povišanih vrednosti PSA v serumu. Vsi preiskovanci so bili vključeni v celoten diagnostični postopek in na koncu jim je bila postavljena tudi diagnoza.

Preiskovancem je bila kri odvzeta v epruveto za vakuumski odvzem. V našem laboratoriju smo določali vrednosti PSA, prostega PSA (PSAp) in IGBFB-3. Analizirali smo vzorce, ki so ustrezali zahtevam za analizo, izločili pa vse tiste, ki so bili sesirjeni, mastni, hemolizirani, ikterični ali kontaminirani.

Serum je bilo treba po odvzemu shraniti na predpisani temperaturi. Vzorci so bili lahko za 24 ur shranjeni pri temperaturi od 2 do 8 °C, za daljše obdobje pa pri temperaturi –20 °C. Izogibali smo se večkratnemu zamrzovanju in odtajevanju, shranjene vzorce pa smo pred uporabo dobro pretresli. Za posamezno določitev smo uporabili minimalen volumen vzorca, tj. 250 µl seruma.

### 3.2 PREDSTAVITEV METODE LIAISON® PSA

Gre za in vitro test za kvantitativno določanje vrednosti PSA v humanem serumu kot tudi v EDTA ali heparinizirani humani plazmi.



**Slika 2:** Analizator LIAISON® PSA proizvajalca Dia Sorin

### 3.2.1 PRINCIP METODE

Metoda za kvantitativno določanje PSA je luminiscenčna tehnika, ki temelji na principu sendviča in je kemiluminiscenčni imunološki test. Kot sledilo se uporabljajo visokospecifična monoklonska (mišja) protitelesa, ki se vežejo na trdni nosilec (magnetni delci). Protitelo sledila prepozna PSA – specifične peptidne epitope.

PSA, ki je prisoten v vzorcih, se med prvo inkubacijo veže na monoklonsko protitelo trde faze, nato pa konjugat protitelesa po izpiranju v drugi inkubaciji reagira s PSA, ki je že vezan na trdo fazo.

Po inkubaciji se nevezani material odstrani z izpiranjem. Nato se doda starterska kultura in sproži se hitra kemiluminiscenčna reakcija. Svetlobni signal in s tem količina konjugata izoluminol protitelesa se meri s fotopomnoževalnikom v relativnih svetlobnih enotah (RLU) in kaže na koncentracijo PSA, ki je prisotna v vzorcih.

### 3.2.2 MATERIALI

#### Reagenti

2,3 ml	suspenzija magnetnih delcev; magnetni delci, prevlečeni z anti-PSA, monoklonska mišja protitelesa
1 ml	kalibrator z majhno koncentracijo
1 ml	kalibrator z veliko koncentracijo
17 ml	raztopina konjugata sledila, sledilo anti-PSA, označeno z izoluminolom, monoklonska mišja protitelesa
29 ml	puffer
10 ml	diluent za redčenje

### **3.2.3 PRIPRAVA REAGENTA**

Preden smo odprli posodice, smo reagente previdno in rahlo pretresli. Paziti smo morali, da se niso spenili. Vsaki posodici smo odstranili čep in na dnu vsake posodice z magnetnimi delci obračali kolešček, dokler suspenzija ni postala rjava. S tem postopkom se delci resuspendirajo. Previdno smo obrisali površino in s tem odstranili preostanek tekočine. Nato smo jih postavili v prostor za reagente na analizatorju s črtno kodo na levi strani in pred uporabo pustili tako 30 minut. Analizator je magnetne delce samodejno premešal in jih popolnoma resuspendiral.

### **3.2.4 KALIBRACIJA APARATURE**

Kalibracija se je izvedla:

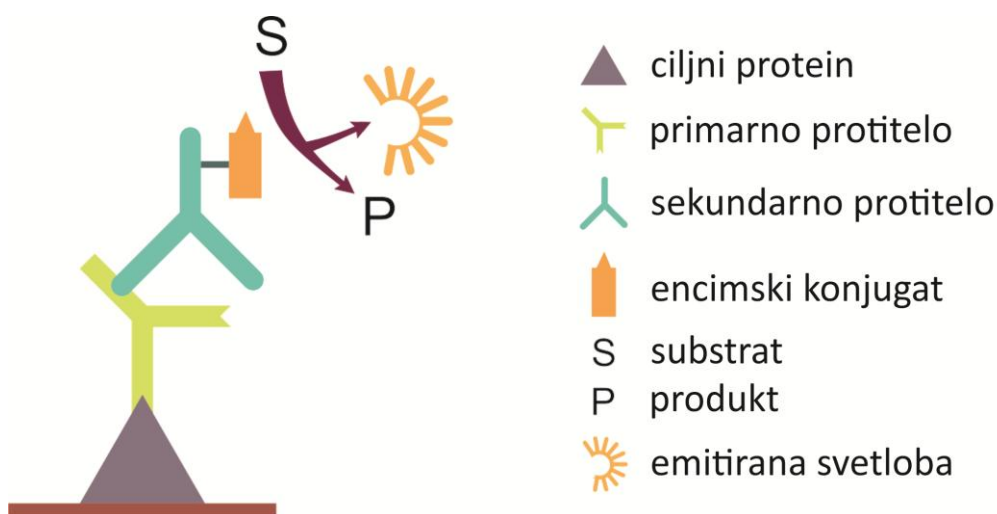
- če sta od prejšnje kalibracije minila več kot 2 tedna,
- ob vsakokratni uporabi novega regenta,
- če je bil analizator servisiran,
- če so bile vrednosti kontrole zunaj dovoljenih območij.



### 3.2.5 OPIS METODE

Merjenje temelji na principu kemiluminiscence.

Kemiluminiscenca je kompetitivna metoda, pri kateri je antigen zaznamovan z luminolom. Gre za dvostransko in heterogeno kemiluminiscentno imunokemijsko tehniko (princip sendviča). Luminiscenca je sevanje za snovi značilne svetlobe kot posledica kemične reakcije. Navadno sta za pojav potrebna dva reaktanta in ustrezen katalizator za potek reakcije. Pri tem nastane vmesni vzbujeni produkt, ki po prehodu v osnovno stanje odda foton določene valovne dolžine. Po imunokemični reakciji antigena s protitelesom dodamo reagent, ki vsebuje vodikov peroksid in encim peroksidazo. Peroksidaza pretvori vodikov peroksid v vodo in povzroči oksidacijo luminola ter s tem spravi luminol v stanje povečane energije. Prek intermediatov nato luminol prehaja v osnovno obliko in pri tem oddaja luminiscenco. Sproščeno svetlobno energijo merimo pri 425 nm.



**Slika 3:** Reakcija kemiluminiscence

### 3.2.6 POSTOPEK TESTA

Za pravilno izvajanje testa smo natančno sledili navodilom proizvajalca LIAISON® PSA Dia Sorina. Parameter vsakega testa je prepoznan s črtno kodo na etiketi reagenta.

50 µl	pipetiranje vzorca, kalibratorja in kontrole
+270 µl	pipetiranje pufra
20 µl	prevlečeni magnetni delci
10 min	inkubacija, ki ji sledi izpiranje
+100 µl	sledilni konjugat
10 min	inkubacija, ki ji sledi izpiranje
3 s	merjenje

### 3.2.7 KONTROLA KAKOVOSTI

Pri zagotavljanju kakovosti smo upoštevali dobro laboratorijsko prakso. Kontrolo kakovosti je treba opraviti vsaj enkrat na dan uporabe. Kadar je kontrola kakovosti zunaj zahtevanega območja, je treba ponovno izbrati kalibracijo in kontrolni test.

### 3.2.8 IZRAČUN REZULTATOV

Analizator sam izračuna koncentracijo PSA za vzorce v µg/l .

### 3.2.9 ZNAČILNOSTI METODE

**Merilno območje** LIAISON® PSA meri koncentracije v območju od 0,09 do 300 µg/l .

**Hookov efekt** ob velikih koncentracijah Pri koncentracijah do 194,000 µg/l zaradi velikosti koncentracij ni bilo opaziti Hookovega efekta.

**Analitična občutljivost** Definirana je kot minimalni zaznavni odmerek, različna od nič za dve standardni deviaciji. Mejna vrednost je bila manj kot 0,09 µg/l .

**Analitična specifičnost** Definirana je kot zmožnost testa, da natančno zazna določeni analit ob možni prisotnosti motečih dejavnikov v matriki vzorca (npr. hemoliza, lipemija,

bilirubinemija). Navzkrižne reakcije z metotreksatom, ciklofosfamidom ali doksorubicinom v terapevtskih območjih niso zaznali.

### **3.3 PREDSTAVITEV METODE LIAISON® fPSA**

Meritve prostega PSA (PSAp) so bile opravljene na analizatorju LIAISON® fPSA (Byk-Sangtec Diagnostica). Osnovni princip metode, postopek testa, kalibracija aparature ter kontrola kakovosti so enaki kot pri določanju PSA z analizatorjem LIAISON® PSA in so bili že opisani.

#### **3.3.1 PRINCIP METODE LIAISON® fPSA**

LIAISON® fPSA je in vitro analiza za kvantitativno določanje prostega PSA (PSAp) v serumu in plazmi. Dve različni visokospecifični monoklonski protitelesi se vežeta na trdni nosilec (magnetni delci). Prosti PSA, ki je prisoten v vzorcih, in kalibrator se vežeta na monoklonsko protitelo trde faze. Sledilno protitelo reagira s prostim PSA, ki se je že vezal. Preostali del sledila in antigena se odstrani s spiranjem.

Doda se starterska kultura, kar povzroči nastanek kemiluminiscenčne reakcije. Koncentracijo prostega PSA v vzorcu in kalibrator se izmeri s kemiluminiscenčno reakcijo. Svetlobni signal in s tem količina konjugata izoluminol protitelesa se meri s fotopomnoževalnikom v relativnih svetlobnih enotah (RLU) in kaže na koncentracijo prostega PSA v vzorcu.

### 3.3.2 MATERIALI

#### Reagenti

1 x 2,3 ml	suspenzija magnetnih delcev; magnetni delci, prevlečeni z anti-fPSA, monoklonska mišja protitelesa
1 x 1,0 ml	kalibrator z majhno koncentracijo
1 x 1,0 ml	kalibrator z veliko koncentracijo
1 x 16 ml	raztopina konjugata sledila: sledilo anti-fPSA, označeno z izoluminolom, monoklonska mišja protitelesa
1 x 10 ml	diluent za redčenje

### 3.3.3 ZAČILNOSTI METODE

Merilno območje LIAISON® fPSA meri koncentracije v območju od 0,03 do 25 µg/l .

Hookov efekt ob velikih koncentracijah Pri koncentracijah do 10.000 µg/l ni bilo opaziti Hookovega efekta.

Analitična občutljivost Definirana je kot minimalni zaznavni odmerek, različen od nič za dve standardni deviaciji. Mejna vrednost LIAISON® fPSA je bila manj kot 0,03 µg/l .

### 3.4 PREDSTAVITEV METODE ZA DOLOČANJE IGFBP-3 ELISA

IBL IGFBP-3 ELISA je encimski imunski test za kvantitativno določanje vrednosti IGFBP-3 v serumu. Test je namenjen za *in vitro* diagnostično uporabo.

#### 3.4.1 PRINCIP METODE

Encimskoimunski test se izvaja na mikrotitrni površini. Kalibratorji in vzorci reagirajo s skupkom monoklonskih protiteles (MAb1), dobro prevlečenih z mikrotirom, in z monoklonskimi protitelesi (MAb2), označenimi s hrenovo peroksidazo (HRP). Po inkubacijski dobi nastane sendvič kompleks, in sicer se vežejo prevlečeni MAb1 – človeški IGFBP-3 in MAb2 – HRP. Z mikrotitrne površine se sperejo nevezana, z encimom označena protitelesa. Vezano, z encimom označeno protitelo, se meri

s kromogeno reakcijo. Doda se kromogena raztopina (TMB) in se inkubira. Reakcija se prekine z dodatkom *stop raztopine* in rezultat se nato odčita na mikrotitrni površini na ustrezni valovni dolžini. Količina substrata se določi kolorimetrično z merjenjem absorbance, ki je sorazmerna s koncentracijo človeškega IGFBP-3.

### 3.4.2 MATERIALI IN REAGENTI

REAGENTI	KOMPLET 96 TESTOV	BARAVNA KODA	VZPOSTAVITEV
Mikrotitrne plošče s 96 anti-IGFBP-3	96 vdolbinic	modra	pripravljena za uporabo
<b>Ab</b>   <b>HR</b>   <b>KONC</b> Konjugat: HRP, označen kot anti-IGFBP-3 (monoklonsko protitelo), v TRIS pufri z govejim serumskim albuminom	1 viala z 0,5 ml	rdeča	razredči se 20-krat s konjugiranim pufrom
<b>KONJ</b>   <b>PUF</b> konjugirani pufer: pufer z govejim serumskim albuminom in tiaminom	1 viala s 10 ml	rdeča	pripravljena za uporabo
<b>KAL</b>   <b>N</b> Kalibrator: N = 1–5 v fosfatni pufer z govejim albuminom, govejim serumom in timolom. Glej natančne vrednosti na viali. Kalibratorji so prerazredčeni. Uporabi razredčen pufer kot ničti kalibrator.	5 liofiliziranih vial	rumena	dodaj 1 ml destilirane vode
<b>RAZR</b>   <b>PUF</b> Pufer za razredčenje. Fosfatni pufer z govejim albuminom, govejim serumom in timolom.	1 viala 100 ml	črna	pripravljena za uporabo
<b>KONTROLA</b>   <b>N</b> Kontrola: N = 1 ali 2 v človeškem serumu s timolom. Kontrole so prerazredčene.	2 liofilizirani viali	srebrna	dodaj 1 ml destilirane vode
<b>IZPIR</b>   <b>RAZ</b>   <b>KONC</b> raztopine za izpiranje	1 viala 10 ml	rjava	razredči 200-krat z destilirano vodo (uporabi magnetno mešalo)
<b>KROM</b>   <b>TMB</b> kromogena TMB-raztopina	1 viala 12 ml	bela	pripravljena za uporabo
<b>STOP</b>   <b>RAZT</b> stop raztopina: HCl 1,0 N	1 viala 12 ml	črna	pripravljena za uporabo

### **3.4.3 PRIPRAVA REAGENTA**

Pred analiznim postopkom smo pripravili reagente, in sicer tako, da smo kalibrator previdno razredčili z 1 ml destilirane vode. Prav tako tudi kontrolo.

Sledila je priprava delovnega konjugata IGFBP-3-HRP, ki smo ga pripravili tako, da smo ustrezne količine konjugatne raztopine razredčili z dodajanjem konjugiranega pufra, in sicer 100 µl 20-krat koncentriranega konjugata IGFBP-3-HRP z do 2 ml konjugiranega pufra. Nato smo konjugat premešali z mešalnikom za homogeniziranje. Konjugat smo pripravljali sproti.

Na koncu smo pripravili še ustrezne količine delovne raztopine za izpiranje, in sicer z dodajanjem 199 količin destilirane vode z dodatkom 1 volumna raztopine za izpiranje (200-krat). Premešali smo z magnetnim mešalom. Neuporabljeno delovno raztopino za izpiranje smo na koncu dneva zavrgli.

### **3.4.4 POSTOPEK TESTA**

Serum smo do izvedbe analize hranili pri temperaturi od 2 do 8 °C. Če analiza ni bila opravljena v 24 urah, smo ga shranili pri temperaturi –20 °C. Pred uporabo so bili vsi vzorci na sobni temperaturi.

Postopek analize smo izvedli po navodilih proizvajalca. Vse potrebne reagente, ki smo jih pripravili in prinesli na sobno temperaturo, smo pred uporabo rahlo pretresli oziroma premešali ter po dvakrat izvedli kalibracijo, kontrolo in vzorca. Pripravili smo čiste plastične posode za raztopine za izpiranje ter posebej pipete za dodajanje reagentov in vzorca. Paziti smo morali, da ni prišlo do zamenjav pipet. S tem smo preprečili navzkrižno kontaminacijo. Natančno smo upoštevali priporočeni čas inkubacije ter za vsako serijo posebej pripravili umeritveno krivuljo. Raztopino kromogena smo razdelili na mikrotitrno površino in jo po 15 minutah izprali. Paziti smo morali, da mikrotitna plošča med inkubacijo z raztopino kromogena ni bila izpostavljena sončni svetlobi.

Označili smo prazne plastične epruvete za vsak vzorec posebej, v vsako epruveto razdelili po 1 ml razredčenega pufra in dodali 10 µl vzorca. Zmešali smo prerazredčeni vzorec, vzpostavili kalibracijo in kontrolo ter izbrali zahtevano število vdolbinic za analizo. Neuporabljene vdolbinice smo dali v vrečko s sušilnim sredstvom in shranili na 2 do 8 °C. Vdolbinice smo zavarovali, nato pa odpipetirali 100 µl pufra za redčenje kot nični

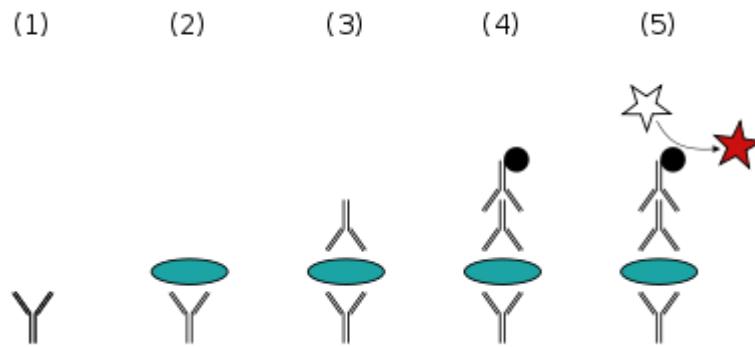
kalibrator. V ustrezno vdolbinico smo posebej odpipetirali še 100 µl vsakega kalibratorja, kontrolo in razredčeni vzorec. V vsako vdolbinico smo dodali 50 µl konjugirane raztopine IGFBP-3-HRP in inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi. Nato smo iz vsake vdolbine izsesali tekočino ter plošče 3-krat sprali. 15 minut po izpiranju smo v vsako vdolbinico odpipetirali 100 µl raztopine kromogena in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Paziti smo morali, da epruvete niso bile izpostavljene neposredni sončni svetlobi. Na koncu smo v vsako vdolbino dodali 100 µl stop raztopine in v 1 uri odčitali rezultate pri 450 nm (referenčni filter 630 ali 650 nm).

### **3.4.5 OPIS METODE ELISA**

Osnova encimskoimunskih tehnik je pritrnitev različnih encimov na protitelesa ali antigene tako, da se njihova reaktivnost ne spremeni. Rezultate ugotovimo s prostim očesom ali s spektrofotometrom. Zaznamovalni encimi so lahko alkalna fostataza, glikoza-6-P-dehidrogenaza ali peroksidaza. Njihovi substrati so lahko kromogeni, fluorogeniluminiscenčne spojine.

**ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)** je imunskoabsorpcijski test, ki je heterogena metoda z označenim encimom. Encim, konjugiran s protitelesom, reagira z barvno substanco, pri čemer nastane obarvan produkt. Pri testu ELISA je ligand antigen ali protitelo, označeno z encimom. Ko protitelesa vežemo na trdno fazo (npr. steno epruvete), se bo antigen iz vzorca vezal na primarna protitelesa (Ab1). Antigen, ki se ni vezal, speremo s pufrom. Nato dodamo z encimom zaznamovano drugo (sekundarno) protitelo, ki tvori sendvič komplekse s prej nastalimi kompleksi Ag-Ab1. Nevezani prebitek zaznamovanega sekundarnega protitelesa speremo s pufrom in dodamo substrat za encim, nato odmerimo barvo oziroma določimo aktivnost encima, ki je obratno sorazmerna s koncentracijo antigena.





1. primarno protitelo, 2. antigen, 3. spiranje s pufrom, 4. sekundarno protitelo, označeno z encimom, 5. substrat za encim (obarvan, fluorescenčen)

**Slika 4: ELISA**

### 3.4.6 INTERNA KONTROLA KAKOVOSTI

Če dobljeni rezultati za kontrolo 1 in/ali kontrolo 2 niso v območju, ki je navedeno na nalepki vial, rezultatov ne morejo uporabiti, razen če je razlaga za razliko utemeljena.

Zaželeno je, da vsak laboratorij pripravi svoj nabor kontrolnih vzorcev, ki jih je treba hraniti zamrznjene v alikvotih. Če kontrole vsebujejo azid, bo to oviralo encimsko reakcijo in je ne moremo uporabiti.

Kriteriji sprejemljivosti za razlike med rezultati vzporednih vzorcev morajo biti usklajeni z dobro laboratorijsko prakso.

Priporočljivo je, da se kontrole rutinsko analizirajo kot neznan vzorec za merjenje analize variabilnosti. Izvedbo analize je treba spremljati s kontrolo kakovosti kontrole krivulje.

### 3.5 STATISTIČNE METODE

Podatke smo analizirali s pomočjo programa Microsoft Office Excel in statističnega paketa SPSS 17.0. V nalogi smo uporabili naslednje statistične metode:

#### 3.5.1 DESKRIPTIVNA STATISTIKA

**Aritmetična sredina ali povprečje** je ena izmed mer srednjih vrednosti (reprezentativne vrednosti spremenljivke). Je vsota vseh vrednosti deljena s številom enot v populaciji. Primerna je za številske, približno normalno porazdeljene spremenljivke. (26) Izračunamo jo po formuli:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N y_i}{N}$$

Slabost aritmetične sredine je, da nanjo močno vplivajo ekstremne vrednosti.

**Mediana (Me) ali centralna vrednost** je ravno tako mera srednje vrednosti. Je tista vrednost statistične spremenljivke, pri kateri je polovica vrednosti večjih, druga polovica pa manjših od nje. Mediana je primerna srednja vrednost za ordinalne spremenljivke. Na njeno vrednost ne vplivajo ekstremne vrednosti.

**Varianca** spremenljivke je ena izmed mer razpršenosti podatkov. Definirana je kot povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Formula za izračun variance, kjer  $y$  predstavlja vrednost spremenljivk,  $\mu$  predstavlja pričakovano aritmetično sredino in  $N$  predstavlja velikost populacije

$$\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - \mu)^2$$

**Standardni odklon ali standardna deviacija** je ravno tako ena izmed mer razpršenosti podatkov in je definiran kot kvadratni koren iz variance. Pove nam za koliko v povprečju vrednosti odstopajo od aritmetične sredine. Večji kot je, večja je razpršenost podatkov in bolj se vrednosti razlikujejo druga od druge. Če je standardni odklon 0, potem v podatkih ni variabilnosti, njihove vrednosti so torej identične.

### 3.5.2 INTERFERENČNA STATISTIKA

Interferenčna statistika se ukvarja s sklepanjem iz vzorca na populacijo. Pri tem si postavimo alternativno domnevo na primer, o velikosti razlike med dvema ali več skupinama v merjeni spremenljivki, ali med povezanosti med spremenljivkama in jo testiramo s pomočjo statističnih metod. Glede na rezultate testiranja, postavljeno hipotezo sprejmemo ali zavrnamo. Pri sklepanju lahko naredimo napako I. vrste (alfa napaka) ali napako II. vrste (beta napaka). Napako I. vrste naredimo kadar zavrnamo pravilno ničelno hipotezo, napako II. vrste pa kadar zavrnamo pravilno alternativno domnevo. Alternativno hipotezo sprejmemo z določeno stopnjo tveganja. Najbolj pogoste vnaprej določene stopnje tveganja so 10 %, 5 % in 1 %.

Ločimo med univariatnimi, bivariatnimi in multivariatnimi statističnimi metodami. V nalogi smo uporabili naslednje:

#### *Univariatne statistične metode*

**Shapiro - Wilk** je neparametrični test, ki se uporablja za preverjanje ničelne domneve, da je proučevana porazdelitev enaka normalni porazdelitvi. Ničelne domneve ne zavrnamo, če je verjetnost, da je ničelna domneva pravilna, večja od 0,05 ( $p > 0,05$ ).

#### *Bivariatne statistične metode*

Medsebojno zvezo dveh spremenljivk ( $x$ ,  $y$ ) proučujemo s statistično metodo korelacije in regresije. Korelacija se razlikuje glede na smer povezanosti, zato lahko govorimo o pozitivni in negativni. Korelacija je lahko velika, majhna ali pa je sploh ni. (27)

**Pearsonov koeficient korelacije** smo uporabili pri ugotavljanju linearnosti metode, ki je matematična in statistična številčna mera, ki predstavlja velikost linearne povezanosti spremenljivk X in Y, merjenih na istem predmetu proučevanja. Tako Spearmanov kot Pearsonov koeficient korelacije lahko zavzameta vrednosti v intervalu  $-1 < r < 1$ .

Izračunamo ga s kovarianco  $C_{XY}$  in standardnim odklonom obeh spremenljivk po spodnji formuli:

$$\rho_{XY} = \frac{C_{XY}}{\sigma_X \cdot \sigma_Y}$$

kjer je kovarianca mera linearne povezanosti med spremenljivkama in jo izračunamo po spodnji formuli:

$$C_{XY} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu_X) \cdot (y_i - \mu_Y)$$

Pozitivna vrednost pomeni, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativna pa, da vrednost ene spremenljivke raste, drug-e pa pada. Vrednost 0 pomeni, da med spremenljivkama ni nobene povezanosti. Na osnovi velikosti koeficienta korelacije lahko sklepamo, kako močna je povezanost med statističnimi enotami. Zavzame lahko vrednosti med -1 in 1. Kadar je vrednost koeficienta korelacije več kot 0,7, govorimo o močni povezanosti. Velikost koeficienta korelacije pa nam ne pove nič o tem, ali je povezava značilna t.j. ali je opažena povezanost v vzorcu prisotna tudi v populaciji.

**Spearmanov koeficient korelacije ( $\rho$ ,  $r_o$ )** je statistični kazalec, ki prikazuje neparametrskost stopnje povezanosti dveh spremenljivk oziroma predstavlja kakovost opisa povezanosti med spremenljivkama, ki jo napravi določena funkcija. Pri tem za razliko od Pearsonovega koeficienta korelacije ne predpostavlja linearne povezanosti spremenljivk in normalne porazdelitve spremenljivk, prav tako pa je z njim moč računati stopnjo povezanosti nezveznih spremenljivk. Zaradi slednjega je Spearmanov koeficient primeren za izračun odvisnosti ordinalnih spremenljivk. Izračuna se po formuli:

$$\rho = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

**T-test ali Studentov t-test** je metoda za testiranje hipotez, kjer testna statistika sledi Studentovi porazdelitvi oziroma T-porazdelitvi. S to metodo preverjamo razlike med aritmetičnima sredinama dveh neodvisnih vzorcev, primerna pa je tudi za preverjanje razlik majhnih vzorcev ( $n < 30$ ). Metoda t-testa predpostavlja normalno porazdelitev obeh vzorcev, enako varianco obeh vzorcev in neodvisne, naključno zbrane podatke obeh vzorcev. Neparometrična različica t-testa je **Mann-Whitneyev U-test**. Ta dela z rangi, in sicer rangira vrednosti od najmanjše do največje ter izračuna povprečni rang za vsako skupino. Povprečna ranga potem primerja med seboj.

**ANCOVA oziroma analiza kovariance** je splošen linearen model, ki združuje ANOVA in regresijo. S to metodo primerjamo povprečja odvisne spremenljivke v dveh ali več skupinah, pri čemer upoštevamo še druge, t. i. moteče spremenljivke, ki tudi vplivajo na odvisno spremenljivko (kovariable, kovariate, sospremenljivke). Izračunamo prilagojeno povprečje v skupinah, kjer pa predvidevamo, da so premice, ki prikazujejo odnos med odvisno spremenljivko in kovariato, v vseh skupinah vzporedne (to je t. i. homogenost regresije). Če je ta predpogoj izpolnjen, potem se metoda prevede v analizo variance, kjer nas zanima, ali je variabilnost med skupinami večja kot variabilnost znotraj skupin. Če to drži, sprejmemo postavljeno hipotezo na določeni stopnji tveganja.

**Kruskal-Wallisow test (H-test)** je neparometričen test in se uporablja za večvzorčno analizo enega samega faktorja in je neparometrična različica enosmerne analize variance. Pri tem testu izhajamo iz predpostavke, da imamo  $n$  neodvisnih vzorcev, za katere želimo ugotoviti, ali med njimi obstajajo značilne razlike. Uporabljam ga lahko tudi, kadar podatki ne izvirajo iz normalno distributivne populacije ali kadar variance vzorcev niso homogene. Pri izvedbi Kruskal-Wallisowega testa vse podatke rangiramo ne glede na to, iz katere skupine je posamezna enota. Range vsake skupine seštejemo in vnesemo v enačbo. Če so vzorci dovolj veliki, tj. večji od petih enot, postane porazdelitev H zelo podobna porazdelitvi hi-kvadrat. Pri tem testu ne moremo trditi, katere skupine se med seboj razlikujejo in katere ne. Test kaže le značilnost razlike med vsemi skupinami. (27)

### ***Multivariatne statistične metode***

**Logistična regresija** je najbolj splošen statistični model za reševanje problemov, pri katerih ima odvisna spremenljivka binomsko porazdelitev, neodvisne spremenljivke pa so lahko opisne ali/in številske.

Predstavimo najprej transformacijo, ki je dala ime logistični regresiji. Ta transformacija se imenuje 'logit' in je opredeljena kot logaritem obojev za dogodek, ki nas zanima. Logit transformacija transformira vrednosti za  $p$ , ki so na intervalu  $[0,1]$ , v interval  $(-\infty, +\infty)$ . Pri  $p=0,5$  je  $\text{logit } p=0$ .

Uporabimo oznake, ki jih poznamo iz regresije. Odvisno spremenljivko označimo  $Y$ , v našem primeru ima samo dve možni vrednosti, eno bomo označili  $Y=1$  (dogodek se zgodi), drugo pa  $Y=0$  (dogodek se ne zgodi). Spremenljivka  $X$  je neodvisna spremenljivka, opisna ali številka.

Za razumevanje rezultatov logistične regresije, je potrebno pojasniti še pojma **obeti** (angl. *odds*) in razmerje obojev (angl. *Odds ratio*). Obeti so razmerje med verjetnostjo, da se nek dogodek zgodi in verjetnostjo, da se ne zgodi. Definirani so na pozitivnem delu realne številke osi. Razmerje obojev (OR) dveh dogodkov pa je enako razmerju njunih vrednosti.

### **Parametrični in neparametrični testi**

Večina statističnih metod temelji na predpostavkah v zvezi s porazdelitvijo populacije. Ker preverjamo domneve o parametrih populacije, jih imenujemo parametrične metode. Pomanjkljivost parametričnih testov je predvsem v tem, da je ponavadi predpostavka o normalni porazdelitvi populaciji le slabo utemeljena, kar lahko privede do negotovosti in možnih napak. Po drugi strani pa lahko s parametričnimi metodami lažje odkrivamo statistične značilnosti in so pomembnejše za analizo podatkov, ki zahtevajo več vzorcev ali skupin. (27) Parametrični testi so naslednji: testiranje populacijskega povprečja, standardni odklon, homogenost varianc, populacijski delež enakosti populacijskih povprečij za dva odvisna in dva neodvisna vzorca, homogenosti varianc, korelacijski koeficient, analiza variance (ANOVA).

Neparametrični testi nam omogočajo hitrejše in preprostejše računanje, saj ne temeljijo na predpostavki o normalni ali drugačni porazdelitvi populacije. Ti testi so tudi manj občutljivi, kar pomeni večjo verjetnost, da bo statistično značilnost nekega rezultata ostala neodkrita. (27) Nekateri neparametrični teste smo uporabili v nalogi in so predhodno opisani: Shapiro – Wilkov test, Mann – Whitneyev test, Spearmanova koeficient korelacija, Kruskal-Wallisov test.

## 4 REZULTATI IN OPIS VZORCA

V vzorec je bilo vključenih 79 bolnikov, 59 (75 %) z benigno hiperplazijo prostate in 20 (25 %) s karcinomom prostate.

**Tabela III:** Deskriptivne statistike merjenih spremenljivk

	Min	Max	Povprečje	Mediana	SD	n
Starost	55	81	67,3	67	6,18	78
BHP	55	81	66,5	67	5,77	58
G5–G10	58	81	69,6	72,5	6,89	20
PSA	1,5	119,0	15,5	10,3	19,15	79
BHP	1,5	81,5	11,4	7,9	11,78	59
G5–G10	3,9	119,0	27,5	16,4	29,68	20
IGF-3	61,2	188,7	139,9	142,8	24,47	79
BHP	66,3	188,7	139,3	142,8	24,04	59
G5–G10	61,2	168,3	141,8	147,9	26,25	20

SD – standardni odklon

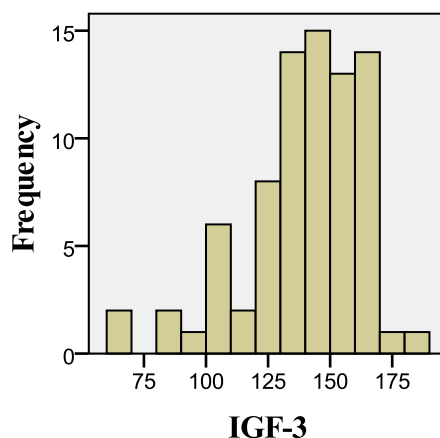
### Starost

Povprečna starost (mediana; standardni odklon – SD) v skupini BHP je 66,5 leta (67; 5,77), v skupini G5–G10 pa 69,6 leta (72,5; 6,89). Razlika v starosti je mejno statistično značilna ( $t = -1,94$ ;  $p = 0,056$ ).

### IGFBP-3

Povprečna vrednost (mediana, SD) IGFBP-3 pri vseh bolnikih je bila 139,9  $\mu\text{g/l}$  (142,8; 24,47). V skupini z BHP je bila 139,3 (142,8; 24,04), v skupini s karcinomom prostate pa 141,8 (147,9; 26,25).

Porazdelitev IGFBP-3 statistično značilno odstopa od normalne (Shapiro-Wilkova statistika = 0,928;  $p < 0,0001$ ), in sicer je levo asimetrična (slika 5).



**Slika 5:** Porazdelitev IGFBP-3

IGFBP-3 vrednosti transformiramo po formuli  $\text{SQRT}((\max(\text{IGFBP-3}) + 1) - \text{IGFBP-3})$ . Od najvišje vrednosti 189, ki smo ji prišteli 1 enoto, torej od 190, smo pri vsakem preiskovancu odšteli dejansko vrednost in razliko korenili. Po transformaciji porazdelitev statistično značilno ne odstopa od normalne (Shapiro-Wilkova statistika = 0,97;  $p = 0,06$ ). Statistično značilnost razlike v povprečnih transformiranih vrednostih smo preverili s t-testom. Razlika se izkaže za statistično neznačilno ( $t = 0,388$ ;  $p = 0,699$ ).

Če testiramo razliko med netransformiranimi vrednostmi z Mann-Whitneyjevim testom, pridemo do istega zaključka (Mann-Whitneyjev test,  $U = 520$ ;  $p = 0,428$ ).

Ker starost vpliva na vrednosti IGFBP-3, preverimo, ali obstajajo razlike med skupinama, če odstranimo njen vpliv. Izvedemo ANCOVO, kjer je pripadnost skupini neodvisna spremenljivka, starost (kovariata) in IGFBP-3 (transformirana) pa odvisni spremenljivki. Predpogoj uporabe metode je homogenost kovarianc: korelacija med starostjo in IGFBP-3 mora biti enaka v obeh skupinah. Predpogoj je izpolnjen, saj se pokaže, da je interakcijski koeficient starost x skupina v modelu ANCOVA neznačilen ( $F = 1,134$ ;  $p = 0,290$ ). Tudi varianci napak po skupinah sta enaki ( $F = 0,164$ ;  $p = 0,687$ ).



**Tabela IV:** Rezultat (odvisna spremenljivka IGFBP-3)

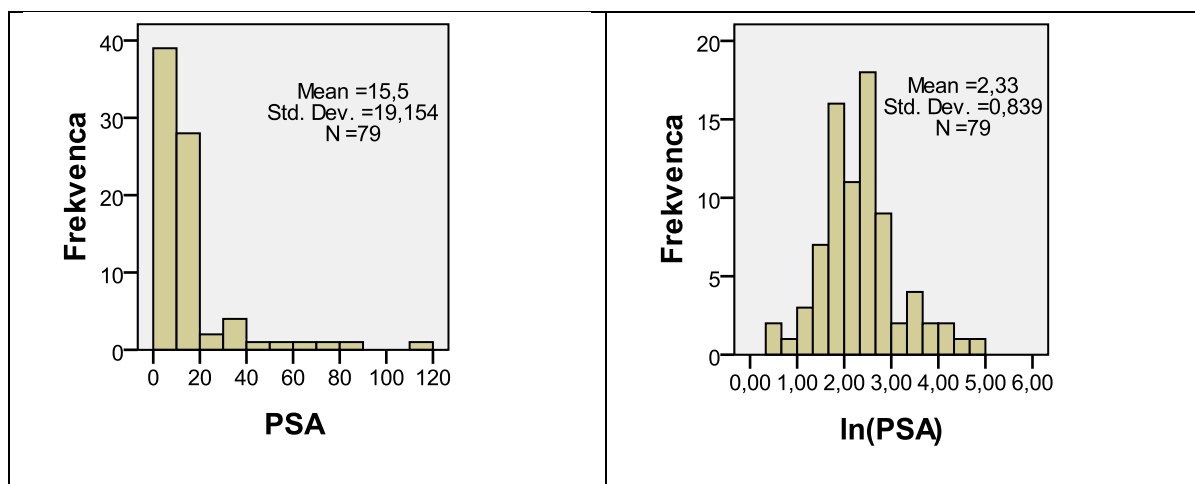
Vir variabilnosti	Vsota kvadratov	Stopnje prostosti	Srednji kvadrat	F	p
popravljeni model	28,84 <sup>a</sup>	2	14,42	5,37	0,007
presečišče	0,001	1	0,001	0,000	0,986
starost	28,45	1	28,45	10,60	0,002
SKUPINA 1	3,12	1	3,13	1,16	0,284

Izkaže se, da je vpliv skupine na IGFBP-3 (transformirane vrednosti), ko kontroliramo starost bolnikov, neznačilen. Po pričakovanjih se pokaže, da je vpliv starosti na vrednosti IGFBP-3 statistično značilen. Z modelom pojasnimo 10 % odvisne spremenljivke.

### PSA

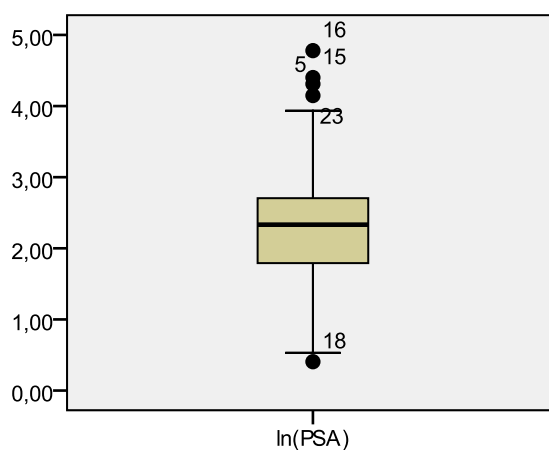
Povprečna vrednost (mediana, SD) PSA pri vseh bolnikih je bila 15,5 µg/l (10,3; 19,15). V skupini z BHP je bila 11,4 µg/l (7,9; 11,78), v skupini s karcinomom prostate pa 27,5 µg/l (16,4; 29,68).

PSA se ne porazdeljuje normalno (Shapiro-Wilkova statistika = 0,594; p = 0,000). Prisotna je močna desna asimetričnost (slika 6, levo) kar je pričakovano.



**Slika 6:** Porazdelitev PSA in ln(PSA)

Naravni logaritem vrednosti PSA porazdelitev približa normalni (slika 6 desno), a od nje še vedno statistično značilno odstopa (Shapiro-Wilkova statistika = 0,966;  $p = 0,031$ ). Prisotne so ekstremne vrednosti (slika 7).



**Slika 7:** Boxplot ln(PSA)

Če ekstremnih vrednosti ne upoštevamo (5 bolnikov z ID 5, 15, 16, 18, 23), potem porazdelitev od normalne statistično značilno ne odstopa več (Shapiro-Wilkova statistika = 0,986;  $p = 0,601$ ).

Najprej testiramo razliko v netransformiranih vrednostih PSA med skupinama z Mann-Whitneyjevim testom in ugotovimo, da so razlike statistično značilne (Mann-Whitneyjev test,  $U = 346,0$ ;  $p = 0,006$ ).

S testiranjem razlik v transformiranih vrednostih PSA med skupinama pridemo do enakega zaključka ( $t = -2,317$ ;  $p = 0,023$ ).

Starost je povezana z vrednostmi PSA, zato pri testiranju razlik njen vpliv izločimo. Izkaže se, da je predpostavka o homogenosti kovarianc po skupinah izpolnjena, saj je interakcija med skupino in starostjo statistično neznačilna ( $F = 0,0001$ ;  $p = 0,990$ ). Test enakosti varianc napak po skupinah je neznačilen ( $F = 2,049$ ;  $p = 0,157$ ).

**Tabela V:** Rezultat ANCOVE (odvisna spremenljivka PSA)

Vir variabilnosti	Vsota kvadratov	Stopnje prostosti	Srednji kvadrat	F	P
popravljeni model	3,03	2	1,52	3,57	0,033
presečišče	0,668	1	0,668	1,58	0,213
starost	0,853	1	0,853	2,01	0,161
SKUPINA 1	1,78	1	1,78	4,20	0,044

Če izločimo vpliv starosti, je vpliv skupine še vedno statistično značilen ( $F = 4,196$ ;  $p = 0,044$ ).

#### 4.1 PSA IN IGFBP-3 TER NJUNA INTERAKCIJA KOT PREDIKTORJI PRIPADNOSTI SKUPINI

Pearsonov koeficient korelacije med IGFBP-3tr (transformirane vrednosti IGFBP-3) in  $\ln(\text{PSA})$  znaša 0,18 in ni statistično značilen ( $p = 0,134$ ). Če pogledamo korelacijo v vsaki od skupin, ugotovimo, da v skupini bolnikov z BHP obstaja šibka negativna povezanost med originalnima spremenljivkama ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,02$ ). V skupini bolnikov s karcinomom prostate korelacije med spremenljivkama ni ( $r = -0,119$ ;  $p = 0,649$ ).

Glavni namen analize je bil ugotoviti, ali bi v presejalnem postopku za odkrivanje raka prostate poleg vrednosti PSA uporabili tudi vrednosti IGFBP-3 in s tem izboljšali njegovo natančnost.

Zgornji izsledki nakazujejo, da bi z vključitvijo interakcije med IGF-3tr in  $\ln(\text{PSA})$  v regresijski model napoved lahko izboljšali.

V tabeli VI so rezultati logistične regresije. Pripadnost skupini je obravnavana kot odvisna spremenljivka. Vidimo lahko, da je interakcija med IGFBP-3 in PSA statistično značilna in tako pripomore k napovedni moči modela.

**Tabela VI:** Rezultat logistične regresije (referenčna skupina bolniki z BHP)

	B	RO	95-odstotni IZ RO		p
			spodnji	zgornji	
IGF-3tr	1,44	4,226	0,770	23,20	0,097
Ln(PSA)	6,35	571,2	2,49	131283,0	0,022
IGF-3tr x Ln(PSA)	-0,774	0,461	0,213	1,001	0,050
konstanta	-13,56	0,000			0,028

IZ – interval zaupanja

RO – razmerje obetov

B – regresijski koeficient;  $\exp(B) = RO$

Verjetnost, da ima bolnik karcinom prostate, se izračuna po naslednji formuli:

$$p(x) = \frac{\exp(-13,6 + 6,3x \ln[(PSA) - 0,8xIGF3tr \times \ln(PSA) + 1,4xIGF3tr])}{1 + \exp(-13,6 + 6,3x \ln[(PSA) - 0,8xIGF3tr \times \ln(PSA) + 1,4xIGF3tr])}$$

Če bolnike razvrstimo v skupini na podlagi verjetnosti, izračunani po zgornji formuli, in razvrstitev primerjamo z dejanskim stanjem, ugotovimo, da jih je na ta način 82,4 % pravilno razvrščenih.

Če bi v regresijski model vključili samo  $\ln(PSA)$  kot neodvisno spremenljivko, je pravilno razvrščenih 77 % bolnikov. Z vključitvijo interakcije se napovedna moč regresijskega modela nekoliko izboljša.

## 4.2 PSA PO SKUPINAH IN VREDNOST IGFBP-3

**Tabela VII:** Opisne statistike netransformiranih IGFBP-3 po skupinah

PSA	Min	Max	Povprečje	Mediana	SD	n
< 4	102	168	144,2	158,1	26,64	7
4–10	87	189	145,5	150,5	22,55	32
> 10	61	168	134,6	137,7	25,03	40
Skupaj	61	189	139,9	142,8	24,47	79

Kruskal-Wallisov test pokaže, da med skupinami ni statistično značilnih razlik v vrednosti IGFBP-3 ( $\chi^2 = 4,051$ ;  $p = 0,132$ ).

Postopek ponovimo še s parametričnim testom na transformiranih vrednostih IGFBP-3.

**Tabela VIII:** Opisne statistike transformiranih IGFBP-3 po skupinah

PSA	Min	Max	Povprečje	Mediana	SD	n
< 4	4,66	9,38	6,52	5,65	1,94	7
4–10	1,14	10,16	6,43	6,29	1,79	32
> 10	4,66	11,35	7,28	7,23	1,57	40
Skupaj	1,14	11,35	6,87	6,87	1,72	79

Med skupinami ni statistično značilnih razlik v transformiranih vrednostih IGFBP-3 ( $F = 2,375$ ;  $p = 0,100$ ).

Izsledki glede razlik med skupinami je enak, če kontroliramo vpliv starosti ( $F = 1,98$ ;  $p = 0,146$ ).

### 4.3 GLEASONOVE VREDNOSTI IN IGFBP-3

**Tabela IX:** Vrednosti IGFBP-3 glede na vrednost Gleasona

Gleason	Min	Max	Povprečje	Mediana	SD	n
G5-G7	107	163	140,25	142,80	18,31	14
G8-G10	61	168	145,35	163,20	41,53	6
Skupaj	61	168	141,78	147,90	26,25	20

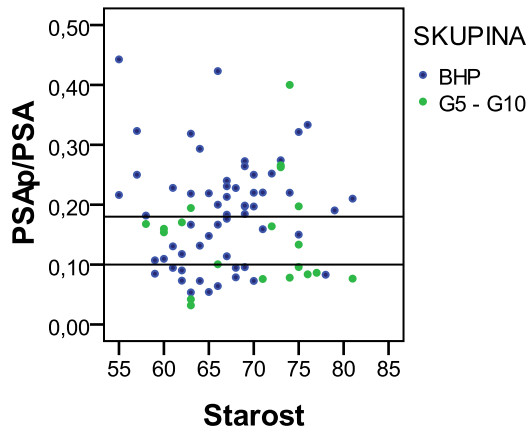
Med skupinama ni statistično značilnih razlik v vrednostih IGFBP-3 (Mann-Whitneyjev test,  $U = 22$ ;  $p = 0,109$ ).

Če uporabimo t-test na transformiranih IGFBP-3 vrednostih, je izsledek enak ( $t = 0,793$ ;  $p = 0,438$ ).

#### 4.3.1 RAZMERJE MED PROSTIM PSA IN CELOTNIM PSA IN PRIPADNOST SKUPINI

Najnižja vrednost razmerja med bolniki z BHP je 5 % in najvišja 44 %, med bolniki s karcinomom pa 3 in 40 %.

Na sliki 8 lahko vidimo, da razmerje popolnoma ne razlikuje med bolniki s karcinomom in bolniki z BHP.



**Slika 8:** Odnos med starostjo in razmerjem PSAp/PSA

Pri 15 % bolnikov s karcinomom je razmerje PSAp/PSA večje od 25 %, pri 10 % pa se giblje med 18 in 25 %. Pri 41 % bolnikov z BHP je vrednost razmerja pod 18 %. Razmerje kot del presejalnega postopka je primeren kazalec za uvrstitev v skupino ( $\chi^2 = 8,23$ ;  $p = 0,04$ ), vendar je na podlagi tovrstnega postopka v konkretnem primeru napačno razvrščenih 37 % bolnikov (5 s karcinomom z razmerjem nad 0,18 in 24 z BHP z razmerjem pod 0,18).

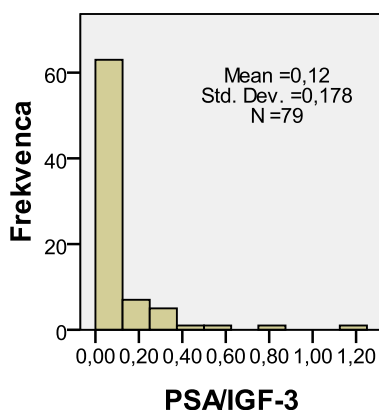
**Tabela X:** Razmerje med prostim PSA in celotnim PSA ter pripadnost skupini

PSAp/PSA	Skupina		Skupaj
	BHP	G5-G10	
> 0,25	10	3	13
0,18-0,25	25	2	27
0,10-0,17	12	8	20
< 0,10	12	7	19
Skupaj	59	20	79

Glede na dobljene rezultate smo želeli v nadaljevanju dodatno analizirati izpeljanke iz prej uporabljenih analiz, da bi ugotovili, ali se rezultati dopolnjujejo.

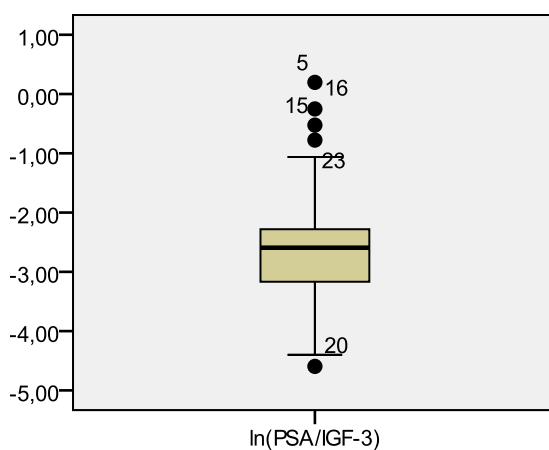
#### ***Kvocient PSA/IGFBP-3***

Porazdelitev kvocienta PSA/IGFBP-3 je močno desno asimetrična in statistično značilno odstopa od normalne porazdelitve (Shapiro-Wilkova statistika = 0,525;  $p < 0,0001$ ).



**Slika 9:** Histogram PSA/IGFBP-3

Naravni logaritem kvocienta se ne porazdeljuje normalno (Shapiro-Wilkova statistika = 0,962;  $p = 0,02$ ). Prisotni so osamelci (slika 10).



**Slika 10:** Boxplot  $\ln(\text{PSA/IGF-3})$

Po odstranitvi osamelcev iz analize (bolniki z ID, prikazanimi na sliki 10) se porazdelitev lepo približa normalni in od nje ne odstopa več (Shapiro-Wilkova statistika = 0,978;  $p = 0,229$ ).

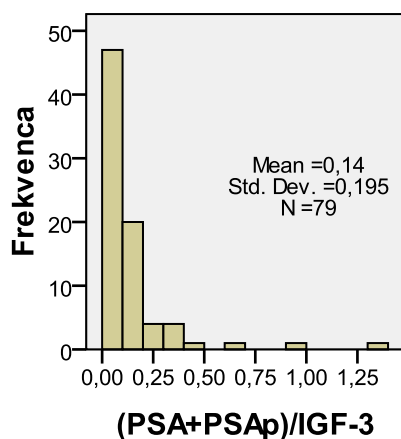
Rezultat t-testa na transformiranih vrednostih kvocienta pokaže na mejno statistično značilnost razlik ( $t = -1,858$ ;  $p = 0,067$ ). Povprečni logaritem kvocienta v skupini bolnikov z BHP je  $-2,77$ , v drugi skupini pa  $-2,41$ .



Če na vseh enotah in netransformiranih vrednostih kvocienta testiramo razlike med skupinama, se izkažejo za statistično značilne (Mann-Whitneyjev test,  $U = 363,5$ ;  $p = 0,011$ ).

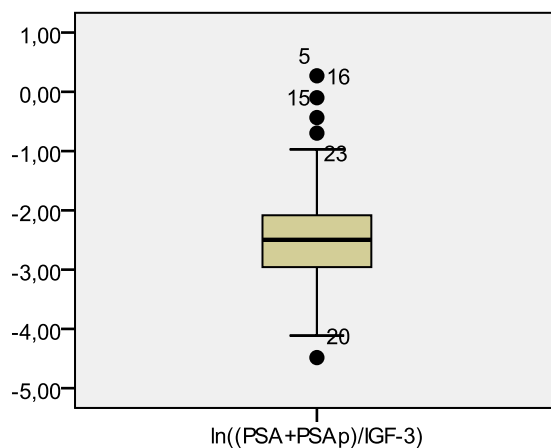
***(PSA + pPSA)/IGFBP-3***

Porazdelitev  $(PSA + pPSA)/IGFBP-3$  statistično značilno odstopa od normalne (Shapiro-Wilkova statistika = 0,536;  $p < 0,0001$ ). Porazdelitev je močno desno asimetrična (slika 11).



**Slika 11:** Porazdelitev  $(PSA+PSAp)/IGFBP-3$

Porazdelitev naravnega logaritma spremenljivke še vedno statistično značilno odstopa od normalne (Shapiro-Wilkova statistika = 0,969;  $p = 0,05$ ). Prisotni so osamelci (slika 12).



**Slika 12:** Boxplot  $\ln(PSA + PSAp)/IGFBP-3$

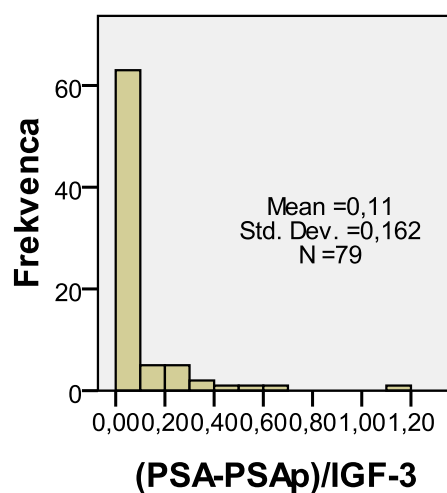
Po odstranitvi osamelcev porazdelitev statistično značilno ne odstopa od normalne (Shapiro-Wilkova statistika = 0,983;  $p = 0,421$ ).

Razlika med skupinama v  $\ln(\text{PSA} + \text{PSAp})/\text{IGFBP-3}$  je statistično neznačilna ( $t = -1,736$ ;  $p = 0,087$ ). Povprečna vrednost v skupini z BHP je  $-2,596$ , v drugi pa  $-2,267$ .

Mann-Whitneyjev test razlik med skupinama v meri  $(\text{PSA} + \text{PSAp})/\text{IGFBP-3}$  pokaže statistično značilne razlike ( $U = 367$ ;  $p = 0,012$ ).

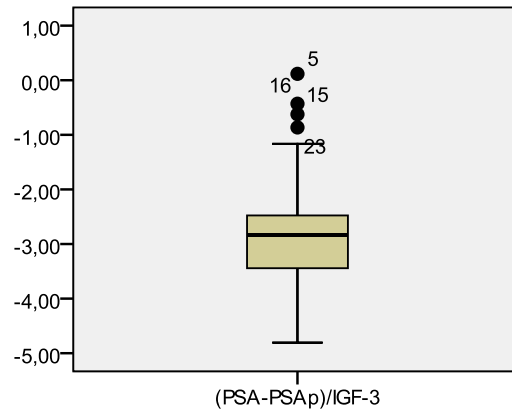
### ***(PSA–pPSA)/IGFBP-3***

Porazdelitev  $(\text{PSA}–\text{PSAp})/\text{IGFBP-3}$  je močno asimetrična v desno in statistično značilno odstopa od normalne (Shapiro-Wilkove statistike = 0,514;  $p < 0,0001$ ).



**Slika 13:** Porazdelitev  $(\text{PSA}–\text{PSAp})/\text{IGFBP-3}$

Porazdelitev naravnega logaritma spremenljivke še vedno statistično značilno odstopa od normalne (Shapiro-Wilkova statistika = 0,959;  $p = 0,012$ ). Prisotni so osamelci (slika 14).



**Slika 14:** Boxplot ln (PSA- PSAp)/IGFBP-3)

Po odstranitvi osamelcev (4 bolnikov) porazdelitev od normalne statistično značilno ne odstopa več (Shapiro-Wilkova statistika = 0,977;  $p = 0,184$ ).

Testiranje med skupinama pokaže, da statistično značilne razlike obstajajo ( $t = -2,063$ ;  $p = 0,043$ ). Povprečna vrednost v skupini bolnikov z BHP je  $-3,02$ , v drugi skupini pa  $-2,58$ .

## 5 RAZPRAVA

Pojavnost raka prostate se v zadnjem desetletju povečuje. Podatki iz Registra raka v Sloveniji iz leta 2007 kažejo, da je diagnosticirani rak prostate na prvem mestu po pojavnosti, in sicer je predstavljal 24,1 % vseh rakov pri moških. Pri mnogih moških se rak prostate ugotovi že v napredovali fazi, kar pomembno vpliva na nadaljnji potek zdravljenja in na preživetje. Z uvedbo priporočila za preventivni pregled prostate enkrat na leto pri moških po 50. letu starosti se je odkrivanje raka bistveno izboljšalo. Pomemben del diagnostične metode so temeljita anamneza, digitorektalni pregled in določanje serumskih vrednosti prostatičnega specifičnega antigena (PSA). Metoda je dokaj zanesljiva, njena občutljivost se giblje med 79 in 82 %. Če je volumen raka večji od 1 ml, je občutljivost 90-odstotna, specifičnost pa je slabša, samo 59-odstotna. Glede na dejstvo, da se koncentracija PSA z leti povečuje, obstajajo orientacijske vrednosti, ki nam povedo, ali gre za sum raka prostate ali ne. Določena je najvišja vrednost za vse starostne skupine, in sicer 3,2  $\mu\text{g/l}$  ; pri starostni skupini med 45. in 65. letom pa je ta meja 2,8  $\mu\text{g/l}$  . Kadar so vrednosti PSA med 3,2 in 10  $\mu\text{g/l}$  , je treba zaradi slabe specifičnosti izpeljati dodatno analizo in diagnostiko. Vzrok za povišane vrednosti serumskega PSA, ki se gibljejo v tem območju, so lahko različna bolezenska stanja, kot so prostatitis, BHP in rak prostate.

Za večjo napovedno vrednost si pomagamo z določanjem še drugih izpeljank PSA, in sicer prostega PSA, gostote PSA (PSA density) ter razmerja med prostim in celotnim PSA, da bi tako zmanjšali število nepotrebnih transrektalnih biopsij prostate, ki so zelo boleče.

Številne epidemiološke raziskave kažejo, da imajo inzulinu podobni rastni faktorji (IGFs) lahko pomembno vlogo pri rasti prostate, pri hiperplaziji in novotvorbah. Rezultati epidemioloških raziskav so potrdili, da velika serumska koncentracija IGF-1 poveča nevarnost za raka in da je velika koncentracija IGFBP-3 povezana z manjšo nevarnostjo. Intraprostatična IGF-1 in IGFBP-3 sta povezana s tumorjem žleze, patološkim nivojem in napredovanjem bolezni. Posledično so sklepi raziskav, da sta IGF-1 in/ali IGFBP-3 označevalca za lokalizirano napredovalo bolezen ali metastazirani rak prostate, lahko pa tudi kazalec za ponovitev bolezni. Prav tako potrjujejo, da je majhna serumska koncentracija IGFBP-3 povezana z metastazami raka prostate.

Glede na omenjena dejstva smo v nalogi želeli dokazati vlogo IGFBP-3 pri skupini bolnikov z BHP in rakom, upoštevajoč tudi ostale prediktorje. Relativno majhno število preiskovancev ( $n = 79$ ), ki smo jih vključili v analizo, smo razdelili v skupini glede na

diagnozo. Izkazalo se je, da je bilo v skupini z BHP 75 % vseh preiskovancev, 25 % z rakom prostate. Starost je prvi pomemben dejavnik obolevanja za rakom prostate in BHP. Analiza je potrdila, da je s starostjo incidenca raka v primerjavi z BHP večja, razlika je mejno statistična značilna ( $t = -1,94$ ;  $p = 0,0056$ ). Vrednost IGFBP-3 v skupini bolnikov z BPH in rakom ni bila statistično značilna, dokazano pa je, da starost vpliva na vrednosti IGFBP-3.

Povprečna vrednost PSA v skupini z BHP je  $11,45 \mu\text{g/l}$ , v skupini s karcinomom pa  $27,7 \mu\text{g/l}$  in je statistično značilna ( $F = 4,196$ ;  $p = 0,044$ ), kar potrjujejo tudi rezultati drugih večjih raziskav.

Glavni namen naloge je bil ugotoviti, ali bi poleg določanja vrednosti PSA v presejalnem postopku za odkrivanje raka prostate uporabili tudi vrednosti IGFBP-3 in s tem izboljšali njegovo natančnost in specifičnost. Rezultati statistične analize nakazujejo, da bi z vključitvijo interakcije med IGFBP-3 in  $\ln(\text{PSA})$  v regresijski model napoved lahko izboljšali. Interakcija med IGFBP-3 in PSA je statistično značilna in tako pripomore k napovedni moči modela. Rezultate bi bilo treba potrditi na večjem vzorcu, saj so pri tako majhnem številu opaženih dogodkov (17 bolnikov s karcinomom prostate, ki so bili vključeni v analizo) rezultati logistične regresije z vključenimi tremi prediktorskimi spremenljivkami manj zanesljivi.

Kot nadgradnjo prve, osnovne razdelitve glede na diagnozo smo v nadaljevanju želeli ugotoviti, ali so med IGFBP-3 znotraj skupine bolnikov z BHP kakršnekoli povezave, zato smo jih razdelili v tri skupine glede na vrednosti PSA in v skupino s karcinomom po Gleasonu. Vrednosti PSA smo razvrstili na  $\text{PSA} < 4 \mu\text{g/l}$ ,  $\text{PSA}$  med 4 in  $10 \mu\text{g/l}$  in  $\text{PSA} > 10 \mu\text{g/l}$ , vrednosti po Gleasonu pa na G5–G7 in G8–G10 ter ugotavljali povezavo z vrednostmi IGFBP-3. Rezultati kažejo, da med skupinami ni statistično značilnih razlik glede vrednosti IGFBP-3.

Pomemben prediktor pri napovedi karcinoma prostate je tudi razmerje med prostim PSA in celotnim PSA. Rezultati kažejo, da je razmerje kot del presejalnega postopka primeren kazalec za uvrstitev v skupino ( $\chi^2 = 8,23$ ;  $p = 0,04$ ), vendar je na podlagi tovrstnega postopka v konkretnem primeru 37 % bolnikov napačno razvrščenih (5 s karcinomom z razmerjem nad 0,18 in 24 z BHP z razmerjem pod 0,18).

Poleg opisanih rezultatov statističnih analiz smo še ugotavljali, kakšen je rezultat kvocienta PSA/IGFBP-3,  $(PSA + PSAp)/IGFBP-3$  ter  $(PSA - PSAp)$  z IGFBP-3. Če uporabimo Mann-Whitneyjev test na nelogaritmiranih vrednostih in vseh enotah ( $U = 365$ ;  $p = 0,011$ ) je zaključek enak.

Pri tej meri so rezultati neparametričnega in parametričnega testa skladni.

## 6 SKLEP

Vzorci vseh 79 preiskovancev z BHP in s karcinomom prostate smo analizirali na aparatih LIAISON<sup>®</sup> in IBL. Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili in ugotovili naslednje:

1. Starost vpliva na pojavnost bolezni. Razlika v starosti v skupini BHP je 66,5 leta (67; 5,77), v skupini G5–G10 pa 69,55 leta (72,5; 6,89) in je mejno statistično značilna ( $t = -1,94$ ;  $p = 0,056$ ).
2. Starost prav tako statistično značilno vpliva na vrednosti IGFBP-3 v serumu. Povprečna vrednost pri vseh preiskovancih je 139,89  $\mu\text{g/l}$ .
3. Vrednosti PSA so med skupinama statistično značilno različne, in sicer v skupini z BHP 11,45  $\mu\text{g/l}$  (7,9; 11,78), v skupini s karcinomom prostate pa 27,47  $\mu\text{g/l}$  (16,35; 29,68). Prav tako je starost povezana z vrednostmi PSA.
4. Interakcija med PSA in IGFBP-3 je statistično značilna in tako pripomore k napovedni moči modela.
5. Kruskal-Wallisov test pokaže, da vrednosti IGFBP-3 med skupinami s  $\text{PSA} < 4$ ,  $\text{PSA} 4\text{--}10$  in  $\text{PSA} > 10$  niso statistično značilne, prav tako nismo dobili statistično značilnih razlik pri vrednotenju vrednosti v skupinah po Gleasonu.
6. Razmerje prosti PSA proti celotnemu PSA, ki se že uporablja kot del presejalnega testa, se je tudi v naši analizi pokazalo kot primeren kazalec za uvrstitev v skupino (BHP ali karcinom).

Rezultati potrjujejo dejstvo, da sta določanje vrednosti PSA ter ugotavljanje razmerja med PSAp in PSA zanesljiv kazalec bolezni in da je starost pomemben dejavnik razvoja bolezni. Vloga določanja vrednosti IGFBP-3 kot presejalnega testa za odkrivanje raka prostate in BHP pa v nalogi nakazuje na statistično značilno napoved, vendar je treba upoštevati, da je bil vzorec relativno majhen, tako da bi bile potrebne nadaljnje raziskave na večjem številu preiskovancev.

## 7 LITERATURA

1. Smith T. Britansko zdravniško združenje. Družinska zdravstvena enciklopedija. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1994: 786–87
2. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Sur Pathol* 1988;12: 619–33
3. [http://anatomedunesa.weebly.com/uploads/1/8/7/1/1871495/benign\\_prostatic\\_hyperplasia\\_-\\_anatomy.pdf](http://anatomedunesa.weebly.com/uploads/1/8/7/1/1871495/benign_prostatic_hyperplasia_-_anatomy.pdf) 10. 6. 2012
4. <http://www.endotext.org/male/male9/male9.html> 10. 6. 2012
5. [http://assets.cambridge.org/97805218/87045/excerpt/9780521887045\\_excerpt.pdf](http://assets.cambridge.org/97805218/87045/excerpt/9780521887045_excerpt.pdf) 14. 8. 2012
6. Grayhack JT. Benign prostatic hyperplasia. The scope of the problem. *Cancer* 1992; 70: Supp 1: 275–9
7. Bostwic DG, Cooner WH, Denis L, Jones GW, Scardino PT, Murphy GP. The association of the benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. *Cancer* 1992; 70: 291–300
8. <http://www.mf.uni-lj.si/dokumenti/cbcc469ebe4393d9d00303each921a75.pdf> 10. 6. 2012
9. Ovčak Z. Vloga patologa pri diagnostiki karcinoma prostate. *Radiol Oncol* 2006; 40 (suppl): 115–120
10. Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CJ. Prostatic carcinoma: Problems in the interpretation of prostatic biopsies. *Hum Pathol* 1992; 23: 223–41
11. Oblak C. Zgodnje odkrivanje, zdravljenje in spremljanje bolnikov z rakom prostate. *Radiol Oncol* 2006; 40 (Supp 1): 127–136
12. [http://www.stat.si/novica\\_prikazi.aspx?id=2982](http://www.stat.si/novica_prikazi.aspx?id=2982) 10. 6. 2012
13. Oblak C. Prostatični specifični antigen, *Onkologija za prakso*, leto X/št. 1, 2006: 37–40
14. Scardino PT. Problem of prostate cancer. *JUrol* 1994; 154: 1677–8
15. Hajdinjak T, Zagradišnik B, Kokalj N. Genetski faktori in rak prostate (vpliv polimorfizmov C825T v genu GNB3 in D 85Y v genu UGT2B15). *Zdrav vest* 2004; 73: 481–494
16. Lailić N. Značaj primene standardiziranog postupka za određivanje PSA. *Jugoslav Med Biohem* 2006; 25(2): 137–141
17. Peehl PM. Prostate specific antigen role and function. 1995; 75: 2021–2026
18. Griffiths JC. Prostate- Specific Acid Phosphatase: Re-evaluation of Radioimmunoassay in Diagnostic Prostatic Disease. *Clin Chem* 26/3 1980: 433–436
19. Ismail HA, Pollak M, et al. Serum insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF – binding protein 3 do not correlate with Gleason score or quantity of prostate cancer in biopsy samples. *BJU* 2003; 92, 699–702
20. Massoner P, Colleselli D. Novel mechanism of IGF-binding protein-3 action on prostate cancer cells: inhibition of proliferation, adhesion, and motility. *Endocrine-Related Cancer* (2009); 16: 795–808
21. Sutkowski DM, Robin L. et al. Growth Regulation of Prostatic Stromal Cells by Prostate – Specific Antigen. *JNCI* 1999; 1663–1669



22. Balarini Lima GA.,Correa L.et al. IGF-I, insulin and prostate cancer
23. <http://epirev.oxfordjournals.org/content/23/1/59.full.pdf> 14. 8. 2012
24. Li L.,Huang X., Huo K. IGFBP-3 polimorphisms and risk of cancer. A meta –analysis. Mol Biol Rep 2010; 37: 127–140
25. Harman SM, Metter J, et al. Serum Level of Insuline – Like Growth Factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-Binding Protein -3 and Prostate – Specific Antigen as Predictors of Clinical Prostate Cancer. Jour pf Clin Endo & Met 2000. Vol 85 (No 11): 4258–65
26. Košmrlj K. Uporabna statistika. Ljubljana 2001: 239
27. Adamič Š. Temelji biostatistike 2. izdaja. Ljubljana 1989: 195

## 8 PRILOGE

**Tabela XI:** Pregled laboratorijskih meritev in kartotečnih parametrov

ID	Starost	PSA	PSAp	p/C	IGFBP-3	Diagnoza
1	67	6	1,1	0,18	142,8	BHP
2	70	5,5	0,4	0,07	158,1	BHP
3	71	5,9	1,3	0,22	127,5	BHP
4	59	5,9	0,5	0,08	173,4	BHP PIN 3
5	81	74,5	5,7	0,08	61,2	G8
6	58	14,9	2,5	0,17	163,2	G8
7	57	6,5	2,1	0,32	158,1	BHP
8	70	5,6	1,4	0,25	132,6	BHP Prostatitis
9	71	7,9	0,6	0,08	137,7	G7
10	68	7,4	0,7	0,09	122,4	BHP PIN3
11	65	10,5	2,3	0,22	102	BHP Prostatitis
12	81	11,9	2,5	0,21	137,7	BHP
13	75	4,5	0,6	0,13	112,2	G6
14	0	4,7	1,1	0,23	132,6	BHP
15	61	81,5	7,7	0,09	137,7	BHP Prostatitis
16	72	119	19,5	0,16	153	G8
17	55	7,4	1,6	0,22	158,1	BHP
18	76	1,5	0,5	0,33	122,2	BHP Susp
19	63	11,2	0,6	0,05	147,9	BHP Susp
20	62	1,7	0,2	0,12	168,3	BHP Prostatitis
21	63	8,7	1,9	0,22	158,1	BHP Prostatitis
22	64	11,4	1,5	0,13	132,6	BHP Susp
23	76	63,3	5,3	0,08	137,7	G7
24	66	19,9	2	0,10	163,2	G7
25	73	15,8	4,2	0,27	163,2	G10
26	66	7,8	0,5	0,06	147,9	BHP
27	74	32	2,5	0,08	132,6	G6
28	67	6,8	1,2	0,18	107,1	BHP
29	62	8,8	1,5	0,17	163,2	G8
30	71	4,4	0,7	0,16	147,9	BHP
31	73	12,4	3,4	0,27	153	BHP
32	69	18,7	5,1	0,27	137,7	BHP
33	69	13,7	2,7	0,20	137,7	BHP Prostatitis

34	75	51,1	4,9	0,10	147,9	G7
35	70	15	3,3	0,22	147,9	BHP PIN 3
36	79	10,5	2	0,19	102	BHP PIN3
37	68	34,3	2,7	0,08	142,8	BHP
38	66	10,5	2,1	0,20	153	BHP
39	67	36	4,1	0,11	137,7	BHP PIN3
40	74	5,5	2,2	0,40	107,1	G5
41	62	4,1	0,3	0,07	163,2	BHP
42	75	2,8	0,9	0,32	102	BHP
43	69	10,3	1,9	0,18	137,7	BPH
44	62	13,3	1,2	0,09	142,8	BHP
45	68	7,9	1,8	0,23	158,1	BHP
46	65	11,5	1,7	0,15	147,9	BHP
47	63	9,4	0,3	0,03	168,3	G9
48	74	5	1,1	0,22	188,7	BHP Prostatitis
49	75	21,8	4,3	0,20	153	G5
50	64	7,5	2,2	0,29	168,3	BHP
51	64	16,5	1,2	0,07	163,2	BHP
52	67	12,5	3	0,24	66,3	BHP
53	69	13,6	2,7	0,20	137,7	BHP
54	61	11,4	2,6	0,23	142,8	BHP PIN3
55	69	15,9	4,2	0,26	168,3	BHP
56	55	6,1	2,7	0,44	142,8	BHP PIN3
57	69	32,4	3,1	0,10	96,9	BHP Susp
58	57	12,4	3,1	0,25	127,5	BHPitis Susp PIN3
59	65	12,9	0,7	0,05	147,9	BHP PIN3
60	72	12,7	3,2	0,25	107,1	BHP Susp
61	59	11,2	1,2	0,11	132,6	BHP
62	63	11,3	3,6	0,32	117,3	BHP
63	63	7,2	1,4	0,19	163,2	G5
64	77	19,7	1,7	0,09	147,9	G6
65	60	7,3	0,8	0,11	158,1	BHP
66	66	5,2	2,2	0,42	158,1	BHP
67	63	5,4	0,9	0,17	153	BHP
68	60	16,9	2,7	0,16	122,4	G5
69	58	3,3	0,6	0,18	168,3	BHP
70	60	3,9	0,6	0,15	163,2	G6
71	73	8	2,1	0,26	127,5	G5

72	67	2,6	0,6	0,23	127,5	BHP
73	61	6,9	0,9	0,13	86,7	BHP Prostatitis
74	75	6	0,9	0,15	147,9	BHP Susp ca
75	66	3,6	0,6	0,17	158,1	BHP
76	70	6,6	1,3	0,20	122,4	BHP Susp
77	78	27,7	2,3	0,08	86,7	BHP
78	67	6,1	1,3	0,21	163,2	BHP
79	63	45,2	1,9	0,04	147,9	G7

**Tabela XII: PSA < 4 µg/l**

ID	Starost	PSA	IGFBP-3	Diagnoza
18	76	1,5	122,2	BHP Susp
20	62	1,7	168,3	BHP Prostatitis
42	75	2,8	102	BHP
69	58	3,3	168,3	BHP
70	60	3,9	163,2	G6
72	67	2,6	127,5	BHP
75	66	3,6	158,1	BHP

**Tabela XIII: PSA 4–10 µg/l**

ID	Starost	PSA	IGFBP-3	Diagnoza
1	67	6	142,8	BHP
2	70	5,5	158,1	BHP
3	71	5,9	127,5	BHP
4	59	5,9	173,4	BHP PIN 3
7	57	6,5	158,1	BHP
8	70	5,6	132,6	BHP Prostatitis
9	71	7,9	137,7	G7
10	68	7,4	122,4	BHP PIN3
13	75	4,5	112,2	G6
14	0	4,7	132,6	BHP
17	55	7,4	158,1	BHP
21	63	8,7	158,1	BHP Prostatitis
26	66	7,8	147,9	BHP
28	67	6,8	107,1	BHP
29	62	8,8	163,2	G8

30	71	4,4	147,9	BHP
40	74	5,5	107,1	G5
41	62	4,1	163,2	BHP
45	68	7,9	158,1	BHP
47	63	9,4	168,3	G9
48	74	5	188,7	BHP Prostatitis
50	64	7,5	168,3	BHP
56	55	6,1	142,8	BHP PIN3
63	63	7,2	163,2	G5
65	60	7,3	158,1	BHP
66	66	5,2	158,1	BHP
67	63	5,4	153	BHP
71	73	8	127,5	G5
73	61	6,9	86,7	BHP Prostatitis
74	75	6	147,9	BHP Susp ca
76	70	6,6	122,4	BHP Susp
78	67	6,1	163,2	BHP

**Tabela XIV: PSA > 10 µg/l**

ID	Starost	PSA	IGFBP-3	Diagnoza
5	81	74,5	61,2	G8
6	58	14,9	163,2	G8
11	65	10,5	102	BHP Prostatitis
12	81	11,9	137,7	BHP
15	61	81,5	137,7	BHP Prostatitis
16	72	119	153	G8
19	63	11,2	147,9	BHP Susp
22	64	11,4	132,6	BHP Susp
23	76	63,3	137,7	G7
24	66	19,9	163,2	G7
25	73	15,8	163,2	G10
27	74	32	132,6	G6
31	73	12,4	153	BHP
32	69	18,7	137,7	BHP
33	69	13,7	137,7	BHP Prostatitis
34	75	51,1	147,9	G7
35	70	15	147,9	BHP PIN3
36	79	10,5	102	BHP PIN3

37	68	34,3	142,8	BHP
38	66	10,5	153	BHP
39	67	36	137,7	BHP PIN3
43	69	10,3	137,7	BPH
44	62	13,3	142,8	BHP
46	65	11,5	147,9	BHP
49	75	21,8	153	G5
51	64	16,5	163,2	BHP
52	67	12,5	66,3	BHP
53	69	13,6	137,7	BHP
54	61	11,4	142,8	BHP PIN3
55	69	15,9	168,3	BHP
57	69	32,4	96,9	BHP Susp
58	57	12,4	127,5	BHPitis Susp PIN3
59	65	12,9	147,9	BHP PIN3
60	72	12,7	107,1	BHP Susp
61	59	11,2	132,6	BHP
62	63	11,3	117,3	BHP
64	77	19,7	147,9	G6
68	60	16,9	122,4	G5
77	78	27,7	86,7	BHP
79	63	45,2	147,9	G7

**Tabela XV: Pozitivna stopnja po Gleasonu**

ID	Starost	PSA	IGFBP-3	Diagnoza
40	74	5,5	107,1	G5
49	75	21,8	153	G5
63	63	7,2	163,2	G5
68	60	16,9	122,4	G5
71	73	8	127,5	G5
13	75	4,5	112,2	G6
27	74	32	132,6	G6
64	77	19,7	147,9	G6
70	60	3,9	163,2	G6
9	71	7,9	137,7	G7
23	76	63,3	137,7	G7
24	66	19,9	163,2	G7

34	75	51,1	147,9	G7
79	63	45,2	147,9	G7