

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



SIMONA TORKAR

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA TORKAR

**POMEN DOLOČANJA KONCENTRACIJE RECEPTORJA
ZA ALFA FETOPROTEIN PRI BOLNIKI Z RAKOM
PROSTATE**

**DIAGNOSTIC VALUE OF ALPHA FETOPROTEIN
RECEPTOR IN DISCRIMINATING PROSTATE CANCER**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. Analize so bile izvedene v podjetju BioCurex v Kanadi in v UKC Ljubljana.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za vsa koristna navodila in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Najlepše se zahvaljujem vsem domačim, prijateljem in sodelavcem za spodbudne besede, podporo in pomoč v času študija.

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja.

Simona Torkar

KAZALO VSEBINE

SEZNAM OKRAJŠAV	6
KAZALO SLIK	8
KAZALO GRAFOV	8
KAZALO PREGLEDNIC	9
POVZETEK.....	11
ABSTRACT	13
1 UVOD	15
1.1 KANCEROGENEZA.....	15
1.2 RAK PROSTATE.....	16
1.2.1 Anatomija prostate	18
1.2.2 Dejavniki tveganja.....	19
1.2.3 Simptomi	19
1.2.4 Klinične manifestacije karcinoma prostate	20
1.2.5 Opredelitev stopnje razširjenosti tumorja (stadij bolezni).....	21
1.2.6 Diagnostika raka prostate	22
1.2.7 Zdravljenje raka prostate	28
1.3 TUMORSKI MARKERJI.....	29
1.3.1 Alfa-fetoprotein (AFP).....	32
1.3.2 Receptor za alfa-fetoprotein (RECAF).....	34
1.3.3 Prostatni specifični antigen (PSA)	38
2 NAMEN DELA	40
3 MATERIALI IN METODE	41
3.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE RECEPTORJA ZA AFP (RECAF)	41
3.1.1 Princip metode.....	41
3.1.2 Materiali	43
3.1.3 Postopek testa CIA	43
3.1.4 Izračun rezultatov	44
3.2 STATISTIČNE METODE.....	46

4	REZULTATI.....	46
4.1	VZORCI IN TESTIRANJA.....	46
4.2	REZULTATI POSAMEZNIH SKUPIN	47
4.3	POTEK OBDELAVE PODATKOV	49
4.4	PRIMERJAVA REZULTATOV MED SKUPINAMA BOLNIKOV	49
4.4.1	<i>Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov.....</i>	<i>49</i>
4.4.2	<i>Test normalne porazdelitve podatkov v obeh skupinah.....</i>	<i>51</i>
4.4.3	<i>Ugotavljanje razlik v koncentraciji RECAF-a med obema skupinama bolnikov</i>	<i>52</i>
4.5	DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST	54
4.5.1	<i>Določitev mejne vrednosti RECAF-a ("cut-off value").....</i>	<i>54</i>
4.5.2	<i>Specifičnost in občutljivost glede na zdrave preiskovance.....</i>	<i>56</i>
4.5.3	<i>Specifičnost in občutljivost glede na bolnike z nemalignimi boleznimi prostate</i>	<i>60</i>
4.5.4	<i>Moč povezave med spremenljivkami (korelacija)</i>	<i>65</i>
5	RAZPRAVA.....	66
6	SKLEP	68
7	LITERATURA	69

SEZNAM OKRAJŠAV

A2M	α 2-makroglobulin
ACR-RECAF	konjugat akridin-RECAF
ACT	α 1-antihimotripsin
AFP	alfa-fetoprotein
AFP-R	receptor za alfa-fetoprotein
AUC.....	<i>area under the curve</i> (površina pod krivuljo)
BHP	benigna hiperplazija prostate
BPSA	benigna oblika PSA
CA125	karcinomski antigen 125
CEA	karcinoembrionalni antigen
CIA	<i>chemiluminescence immuno-assay</i> (kemiluminiscenčni imunski test)
cPSA	koncentracija PSA v kompleksu s proteaznimi inhibitorji (vezana oblika PSA)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DRP	digitalni rektalni pregled
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Ameriška agencija za hrano in zdravila)
FSH	Folikule-stimulativni hormon
GnRH	gonadotropin sproščujoči hormon
HCG	humani horionski gonadotropin
HER-2	receptor za humani epidermalni rastni faktor 2
HGPIN.....	<i>high-grade PIN</i> (prostatična intraepitelijska neoplazija visoke stopnje)
HK2	humani kalikrein 2
HSA	humani serumski albumin
kRECAF enot.....	tisoč RECAF enot
LH	luteinizirajoči hormon
MCF-7.....	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> (celična linija adenokarcinoma dojke)
PIN	prostatična intraepitelijska neoplazija
pro-PSA	prekurzor PSA
PSA	prostatni specifični antigen
PSA-ACT	kompleks med ACT in PSA
PSAD	<i>PSA density</i> (gostota PSA)
PSA-DT	<i>PSA doubling time</i> (čas, ki je potreben, da se vrednost PSA v serumu podvoji)
PSAD-TZ	gostota PSA, ki izhaja iz tranzicijske cone prostate

PSAV	<i>PSA velocity</i> (letni dvig PSA v serumu)
RECAF	receptor za alfa-fetoprotein
RIA	radioimunski test
ROC.....	<i>receiver operating characteristics</i> (krivulja, ki prikazuje razmerje med deležem resnično pozitivnih od lažno pozitivnih primerov)
Sg1	semenogelin 1
Sg2	semenogelin 2
Sk1.....	skupina 1
Sk2.....	skupina 2
TCEP	tris (2-karboksietil) fosfin
tPSA	celokupna koncentracija PSA
TRUZ	transrektalni ultrazvok
TSG	tumor-supresorski gen

KAZALO SLIK

Slika 1: Najpomembnejša lokacija raka po spolu, Slovenija 2007 (3)	17
Slika 2: Groba letna incidenčna stopnja izbranih rakavih obolenj po spolu, Slovenija 1950–2007 (3)	17
Slika 3: Anatomija prostate (15)	19
Slika 4: Stopnje razširjenosti primarnega tumorja prostate (T1, T2, T3 in T4) (25)	21
Slika 5: Set Histo-RECAF (96)	36
Slika 6: (A) Različna tkiva, obarvana s Histo-RECAF, BHP, 40x; (B) adenokarcinom prostate 200x; (C) zdravo debelo črevo, 200x; (D) rak debelega črevesja, 100x (82)	37
Slika 7: Strukturna formula PSA (100)	38
Slika 8: Reakcijska shema v odsotnosti RECAF-a v vzorcu (107)	42
Slika 9: Reakcijska shema v prisotnosti RECAF-a v vzorcu (107)	42
Slika 10: Reakcija kemiluminiscence akridinijevega estra (108)	42
Slika 11: Tipična oblika umeritvene krivulje	45

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Vrednosti za f/t PSA v skupini 1 (rak prostate) in v skupini 2 (BHP) glede na vrednosti celotne koncentracije PSA (31)	25
Graf 2: Krivulja ROC, ki primerja uspešnost tPSA in f/t PSA v razlikovanju med zdravimi posamezniki in bolniki z rakom prostate (31)	25
Graf 3: Prikaz vpliva mejne vrednosti na specifičnost in občutljivost analita (66)	31
Graf 4: Število vzorcev v posameznih skupinah	46
Graf 5: Kvartilni diagram – porazdelitev rezultatov za RECAF v obeh skupinah bolnikov	50
Graf 6: Nenormalna porazdelitev rezultatov v skupini 1	51
Graf 7: Nenormalna porazdelitev rezultatov v skupini 2	52
Graf 8: Normalna porazdelitev rezultatov v kontrolni skupini	55
Graf 9: Kvartilni diagram – primerjava porazdelitve rezultatov kontrolne skupine, skupine 1 (rak prostate) in skupine 2 (nemaligne bolezni). Izračunana mejna vrednost (4,80 kRECAF enot) je označena s sivo črtkano črto.	56

Graf 10: Frekvenčni diagram porazdelitve podatkov med kontrolno in skupino rakavih bolnikov	56
Graf 11: Krivulja ROC za RECAF (rak prostate/zdravi)	60
Graf 12: Frekvenčni diagram porazdelitve podatkov skupine 1 (rak prostate) in skupine 2 (nemaligne bolezni). Mejna vrednost (4,80 kRECAF enot/ml) je označena z rdečo črto.	61
Graf 13: Krivulja ROC za RECAF (rak/nemaligne bolezni)	62
Graf 14: Kvartilni diagram – primerjava porazdelitve PSA v obeh skupinah bolnikov z izločenimi osamelci	62
Graf 15: Krivulja ROC za PSA (rak/nemaligne bolezni prostate)	63
Graf 16: Kvartilni diagram – porazdelitev rezultatov za fPSA v obeh skupinah bolnikov brez osamelcev. Mejna vrednost (13 % fPSA) je označena s črtkano črto.	64
Graf 17: Krivulja ROC za delež fPSA (rak/nemaligne bolezni prostate)	64

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Enačbi za izračun specifičnosti in občutljivosti testa (39)	31
Preglednica 2: Pridobljeni rezultati za skupino 1: RAK PROSTATE	47
Preglednica 3: Pridobljeni rezultati za skupino 2: BHP, vnetje, atrofija, HGPIN	48
Preglednica 4: Pridobljeni rezultati za kontrolno skupino	49
Preglednica 5: Vrednosti statističnih parametrov obeh skupin bolnikov	50
Preglednica 6: Testiranje normalne porazdelitve rezultatov obeh skupin bolnikov	51
Preglednica 7: Povprečni rang in vsota rangov	54
Preglednica 8: Testne statistike (Mann-Whitneyjev test)	54
Preglednica 9: Test normalne porazdelitve v kontrolni skupini	54
Preglednica 10: Podatki za izračun spodnje in zgornje referenčne meje	55
Preglednica 11: Vrednosti parametrov deskriptivnih statistik kontrolne skupine in skupine rakavih bolnikov	57
Preglednica 12: Mann-Whitneyjev test	57
Preglednica 13: Število pozitivnih in negativnih testov glede na diagnozo (PP – pravilno pozitiven test pri bolniku z rakom, PN – pravilno negativni test pri zdravem preiskovancu, LP – lažno pozitiven test pri zdravem preiskovancu, LN – lažno negativni test pri bolniku z rakom)	57

Preglednica 14: Občutljivost in specifičnost pri različnih mejnih vrednostih	58
Preglednica 15: Analiza ROC za RECAF (rak prostate/zdravi)	59
Preglednica 16: Analiza ROC za RECAF (rak/nemaligne bolezni prostate)	61
Preglednica 17: Analiza ROC za PSA (rak/nemaligne bolezni prostate)	63
Preglednica 18: Analiza ROC za delež fPSA (rak/nemaligne bolezni prostate)	64
Preglednica 19: Korelacija med PSA, deležem fPSA in RECAF-om	65

POVZETEK

V klinični praksi se za diagnostiko raka prostate od tumorskih markerjev uporablja PSA, ki pa ima pomankljivost glede specifičnosti detekcije raka. Z namenom izboljšanja diagnostike potekajo raziskave v smeri odkritja novih markerjev maligne transformacije, ki bi presegle učinkovitost aktualnega. V okviru naloge smo se osredotočili na enega izmed njih, to je receptor za alfa-fetoprotein ali krajše RECAF, ki mu predpisujejo lastnosti vsesplošnega tumorskega označevalca. Za določitev koncentracije proteina v serumu smo uporabili kemiluminiscenčno imunsko metodo (CIA). Pri izvedbi smo uporabili anti-RECAF protitelesa, ki so vezana na trdnem nosilcu. Za prosta mesta na protitelesih tekmuje serumski RECAF z znano koncentracijo konjugata RECAF-akridin. Nižji odziv vodi do večje vsebnosti RECAF enot v vzorcu. Koncentracijo izračunamo iz umeritvene krivulje z negativnim naklonom, ki jo pridobimo s pomočjo standardnih RECAF raztopin. Koncentracijo proteina določamo v RECAF enotah na mililiter vzorca ("RU/ml").

Za določanje klinične uporabnosti novega tumorskega markerja smo v raziskavo vključili 3 skupine preiskovancev. V prvo skupino smo uvrstili bolnike z diagnosticiranim rakom prostate. Diagnoza je bila potrjena s histološko preiskavo tkiva. Druga skupina je vključevala vse ostale bolnike z drugimi boleznimi prostate. Med druge spremembe tkiva smo šteli benigno hiperplazijo prostate, vnetje, atrofično spremembo in tiste, ki so po histološki preiskavi imeli izražen predmaligni vzorec karcinoma prostate. Pri večini je bila prisotna kombinacija zgoraj navedenih oblik. Tretja skupina je bila kontrolna skupina desetih zdravih preiskovancev. Prvi in drugi skupini bolnikov je bila izmerjena koncentracija celokupnega PSA, odstotek proste frakcije PSA, velikost prostate, izveden je bil digitalni rektalni pregled in izmerjena vsebnost RECAF-a. Kontrolni skupini smo izmerili le koncentracijo RECAF-a.

Glede na kontrolno skupino smo pri mejni vrednosti 4,80 kRECAF enot izračunali 52% občutljivost in 100% specifičnost. Med bolniki z rakom in benigno hiperplazijo nismo dokazali statistično značilne razlike v koncentraciji RECAF enot. Merjenje z metodo CIA glede na naše rezultate torej ne loči bolnikov z benigno in maligno obliko bolezni.

V okviru naloge smo primerjali RECAF z aktualnim tumorskim markerjem PSA ter z njegovo prosto frakcijo, ki je povišana v primeru hiperplazije tkiva. Pri upoštevanju mejne

vrednosti 3 ng/ml smo za PSA izračunali diagnostično občutljivost 88 % in specifičnost 38 %. Krivulja ROC prikazuje odvisnost diagnostične specifičnosti od občutljivosti, torej zmogljivost metode v razločevanju med malignim in nemalnim tipom bolezni. Na podlagi majhne površine pod krivuljo ROC (0,62) naši rezultati nakazujejo, da je prosta frakcija neprimerna za diagnostiko raka prostate.

ABSTRACT

In clinical practice for the diagnosis of prostate cancer, among tumor markers PSA is most commonly used; however, it fails to provide the required specificity. With a view to cancer detection improvement, the research is planned in a way to discover new markers of malignant transformation with enhanced clinical significance. This thesis focuses on one of them, namely to alpha-fetoprotein receptor (RECAF), which could prove useful as a widespread cancer marker. For measuring the circulating RECAF in serum samples, chemiluminiscence immunoassay (CIA) was used. The principle of the assay involves the competition of constant amount of labeled RECAF with RECAF in the serum sample for binding to the anti-RECAF monoclonal antibody immobilized on the solid phase. A reduced signal relatively means a higher concentration of RECAF obtained in the serum sample. To calculate the RECAF values from the sample, the calibration curve with a negative slope is used. A standard curve is prepared with RECAF Calibrators. The results are expressed in RECAF units/ml (RU/ml).

To clarify the clinical potential of the new tumor marker, three test groups were compared. The first group comprised prostate cancer patients. Their diagnosis was determined with the histological examination. The second group of patients had other prostate diseases, such as benign hiperplasia, prostate atrophy, inflammation, prostatic intraepithelial neoplasia or had premalignant patterns of prostate cancer visible after the histological examination. Combinations of those conditions were present with the majority of them. The control group with ten healthy individuals was the third group of investigation. Blood samples of the patients from the first two groups were taken for the measurement of total PSA, percentage of free PSA and RECAF. Moreover, digital rectal examinations and measurements of prostate volume were also performed. The control group was only tested for RECAF.

Regarding the results of the control group, the reference range was calculated. According to the cut-off value, the diagnostic specificity and sensitivity were determined. The statistical discrimination of cancer patients from patients with non-malignant diseases was not proven. This prospective study revealed that the measurement of RECAF with the CIA method is not a significant useful predictor in discriminating cancer from non-cancerous diseases.

RECAF performance was compared to the total PSA and the percentage of fPSA, which is raised in benign conditions. In discriminating cancer patients, the cut-off value of 3 ng/ml for PSA yielded specificity level of 38% at sensitivity level of 88%. The receiver operating characteristic (ROC) curve represents the ability of the test to discriminate malignant from non-malignant samples. The results of this research indicated that the free-to-total PSA ratio did not have a high discriminating power. This finding was supported by the relatively low area under ROC curve of 0.62.

1 UVOD

Število obolelih za rakom se naglo povečuje, kar povečuje skrb in potrebo po izboljšanju rezultatov zdravljenja. Bolezen postaja eden izmed vodilnih vzrokov smrti po svetu. Uspešno terapijo omogoča predvsem zgodnje odkritje bolezni, predvsem tistih tipov, ki so znani kot tihi ubijalci in pri katerih se znaki bolezni pokažejo šele v poznih stadijih.

1.1 KANCEROGENEZA

Rak je kompleksen patološki proces, ki nastane kot posledica spremenjenega genoma. Zaradi okvarjenega nadzora celične delitve in apoptoze pride do nebrzdane delitve celic (1). Proces kancerogeneze poteka v več stopnjah. Prva stopnja je iniciacija, sledi ji promocija ter na koncu progresija bolezni (2). Iniciacija nastopi, ko je celica izpostavljena delovanju neke kancerogene snovi, ki jo imenujemo iniciator. Iniciator povzroči nepovratne mutacije DNK. Za razvoj maligne neoplazme je potrebna tudi prisotnost promotorja, ki poveča kancerogenost kemičnih snovi, toda sam po sebi ni kancerogena snov. Posledica delovanja promotorja je pospešeno razmnoževanje spremenjene celice. V fazi progresije pride do izražanja pridobljenih malignih lastnosti (1). Kancerogene dejavnike razdelimo na fizikalne, kemične in biološke. Vsi spremenijo DNK bodisi tako, da izzovejo mutacije (mutageni dejavniki), bodisi da spremenijo izražanje genov brez poseganja v strukturo DNK (epigenetski dejavniki) (2). Genetske okvare somatskih celic prizadenejo dve vrsti genov, ki sta pomembni za neoplastično transformacijo. Prva vrsta genov so protoonkogeni, ki se aktivirajo in izzovejo celično razmnoževanje. Druga vrsta genov so tumor-supresorski geni, ki se med kancerogenezo inaktivirajo in so odgovorni za preverjanje podvojene DNK ter nadzor celičnega cikla (1).

Onkogeni

Onkogeni so spremenjeni protoonkogeni in vključujejo gene, ki kodirajo različne rastne faktorje, receptorje za rastne faktorje, signalne prenašalce, jedrne transkripcijske faktorje in regulatorje celičnega ciklusa. Onkogeni nosijo zapise za beljakovine, imenovane onkoproteini. Delujejo dominantno, kar pomeni, da je za pospešeno delitev celic dovolj že en okvarjen alel (2).

Tumor-supresorski geni

V procesu kancerogeneze se tumor-supresorski geni (TSG) inaktivirajo, rezultat je odsotnost aktivnega proteina, ki kontrolira celični cikel in preverja pravilnost podvojene DNK. Za inaktivacijo gena morata biti mutirana oba alela. En normalni alel gena namreč še preprečuje in zavira kancerogenezo. Produkti TSG so molekule na celični površini, proteini, ki zavirajo prenos signalov rasti faktorjev, ter proteini, ki uravnavajo transkripcijo DNK in celični cikel.

Ključni TSG je p53, ki kodira za protein p53. Protein p53 ima pomembno vlogo pri preverjanju napak DNK in kontroli celičnega cikla. V primeru poškodovane DNK ustavi delitev celice, toda če se DNK kljub temu ne popravi, p53 sproži apoptozo celice. Ta mehanizem prepreči, da bi se genetske napake prenašale naprej (2).

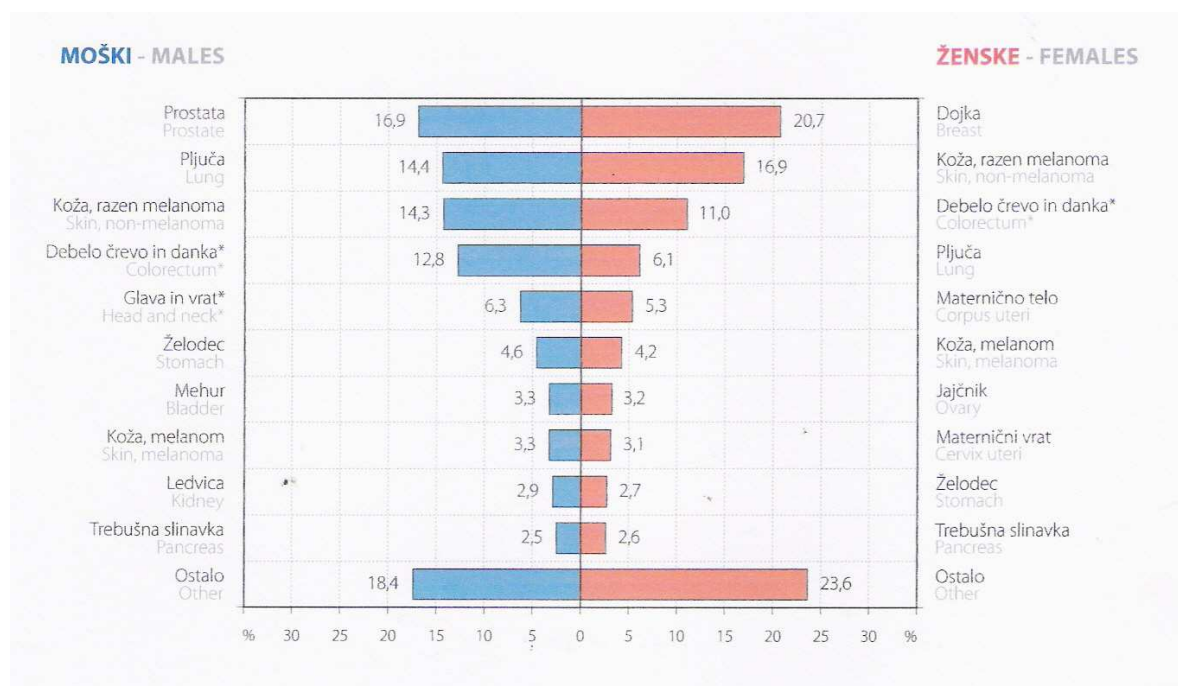
1.2 RAK PROSTATE

Glede na število obolelih za rakom, pri moških od leta 2007 rak prostate zaseda prvo mesto v Sloveniji (Slika 1). Rak prostate je zamenjal pljučnega raka, ki je bil na prvem mestu vse od leta 1967 (3). Gre za bolezen, ki najbolj prizadene starejšo populacijo, kar pomeni, da je zaradi staranja prebivalstva te bolezni vedno več (Slika 2) (4). Raziskave nakazujejo, da je za rakom prostate zbolelo že približno 30 % moških nad 50 let in 80 % moških nad 80 let, ki ne kažejo nobenih kliničnih znakov (5). Kljub kirurški in radiacijski terapiji se bolezen ponovi pri 30 % bolnikov (6).

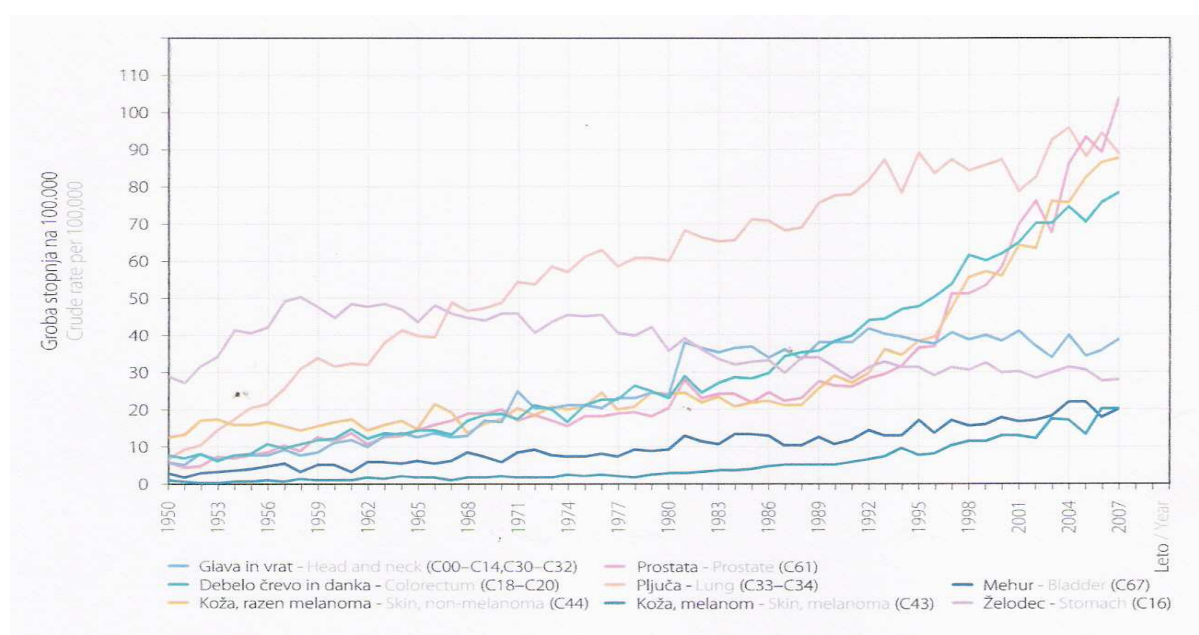
Rak prostate je drugi najpogostejši vzrok smrti zaradi raka na svetu (7). Ker se bolezen v zgodnjih fazah težko opazi, bolniki pomoči ne poiščejo dovolj zgodaj (8). V primeru metastaziranja je bolezen skoraj neozdravljiva, z zdravili le nekoliko podaljšamo bolnikovo življenje (9).

Iz podatkov lahko sklepamo, da je rak prostate postal velik zdravstveni problem moške populacije, zato je potrebno izrazito izboljšati diagnostiko in terapijo (4). V prvi vrsti potrebujemo tumorske markerje, ki bi natančno opredelili posameznikovo tveganje za nastanek bolezni ter s tem zmanjšali posledice, povezane s pozno odkritim rakom prostate (10).

Odkritje prostatnega specifičnega antigena (PSA) in začetek njegove uporabe v klinični praksi v zgodnjih 1990-ih letih je pomenilo velik napredek na področju diagnostike raka prostate. Začetek uporabe PSA je prinesel močan porast incidence bolezni in močno zmanjšal število na novo odkritih bolnikov s prisotnimi metastazami, kar je posledično pripeljalo do upada smrtnosti (11).



Slika 1: Najpomembnejša lokacija raka po spolu, Slovenija 2007 (3)



Slika 2: Groba letna incidenčna stopnja izbranih rakavih obolenj po spolu, Slovenija 1950–2007 (3)

1.2.1 Anatomija prostate

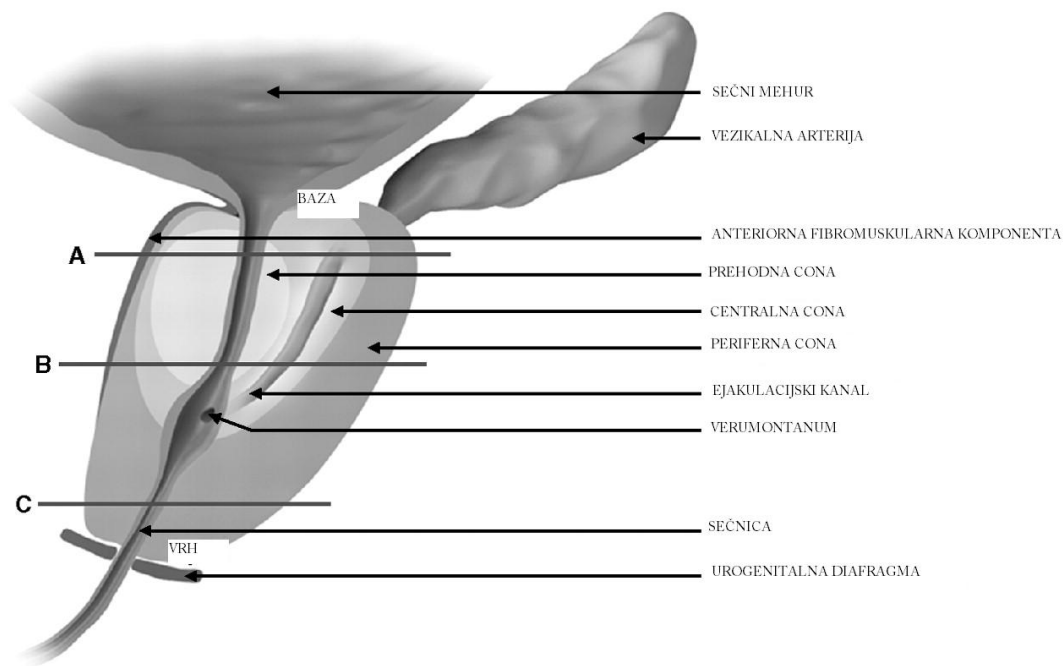
Prostata je sekundarni moški spolni organ in tehta okrog 20 g (12). Nahaja se v subperitonealnem prostoru med medenično prepono in peritonealno votlino (13). Prostatu obdajajo rektum na desni, sečni mehur na vrhu in sramna kost na levi strani (14). Žleza poteka od vratu mehurja vse do začetnega dela sečnice, ki ga obdaja. Makroskopsko ima prostata obliko oreha, in jo ločimo na bazo prostate, vrh, ter sprednji, zadnji in spodnji del. Vrh prostate se nahaja na zgornji površini urogenitalne prepone, baza prostate pa je pritrjena na vrat mehurja. V sprednji ozek in izbočen del vstopa prostatni del sečnice. Zadnji del, ki se nahaja pred steno rektuma, je trikoten in raven (13).

Prostatu delimo na vezivno (fibromuskularno anteriorno) cono in na tri glandularne (žlezne) cone: centralno, prehodno in periferno cono (14). Med seboj se razlikujejo po histoloških, anatomskih, bioloških in patoloških lastnostih (13). Največji delež obsega periferna cona (70 %), sledita ji centralna (25 %) in prehodna cona (5 %) (14). Rak prostate po večini izvira iz periferne cone (70 %). Nasprotno se v centralni coni rak skoraj ne pojavlja (le 5 % primerov). 25 % raka prostate izvira iz prehodne cone, ki ima podoben embrionalni izvor kot periferna cona, razlikujeta se le v vezivni komponenti (13). Sečnico obdaja že omenjena prehodna cona, v kateri s starostjo pride do hiperplazije (14).

Proksimalni del sečnice obdajajo gladke mišice preprostatičnega sfinktra. (14). Distalni sfinkter sečnice sega v zadnji del periferne cone prostate, zato njegova okvara med invazivnimi diagnostičnimi pregledi lahko vodi do urinske inkontinence (13). Celotna žleza je obdana z ovojnico, ki pri hiperplaziji onemogoča širjenje tkiva v okolico (12).

Povečana količina tkiva, ki nastane pri maligni ali benigni bolezni prostate, pritiska na prostatični del sečnice, zato povzroča težave pri uriniranju (12).

Prostata ima pomembno vlogo pri ohranitvi gibljivosti spermijev. Izloča namreč tekočino, ki prispeva 30 % h končni semenski tekočini (12). Posebne sestavine prostatične tekočine so: citrat (vzdržuje osmotsko ravnovesje in predstavlja medij za transport spermijev), cink (deluje protibakterijsko), PSA in prostatična kislina fosfataza (14). Prostata vsebuje encim 5 α -reduktazo, ki pretvori moški spolni hormon testosteron v aktivno obliko dihidrotestosteron (12).



Slika 3: Anatomija prostate (15)

1.2.2 Dejavniki tveganja

Dejavniki tveganja za razvoj raka prostate so – razen starosti in dednosti – nepoznani. Znano je, da se z napredovano starostjo večja pojavnost bolezni (16). Incidenca raka prostate je v razvitem svetu izjemno visoka (17).

Pomemben dejavnik tveganja je tudi dednost (16). Iz epidemioloških raziskav sklepamo na podvojeno tveganje, če je obolel en bližnji sorodnik (brat ali oče). Če sta obolela dva ali več bližnjih sorodnikov, je tveganje za razvoj bolezni od 5- do 11-kratno (4). Z družinsko anamnezo povezujejo 21 % bolnikov (18). Bolniki z družinsko anamnezo naj bi izkazovali večjo možnost ponovitve bolezni, celo po operativni odstranitvi prostate. Imajo tudi za 10 % večjo možnost za razvoj metastaz, s čimer so deležni slabše prognoze, kar pomeni manjšo možnost ozdravitve (19).

1.2.3 Simptomi

Simptomov raka prostate v začetnem obdobju bolezni skoraj ni opaziti; bolezen se v več kot 80 % primerih kaže kot asimptomatska (20). V poznih fazah simptomi raka prostate posnemajo simptome benigne hiperplazije prostate (BHP) (16). Prvi znaki, ki kažejo na rak, so ponavadi bolečine v kosteh (zaradi metastaz) in kri v urinu. Pojavi se lahko tudi

počasnejše odtekanje urina ali pogostejše uriniranje (21). Prisotnost metastaz lahko povzroča tudi simptome, kot so izguba teže, anemija in utrujenost (14).

1.2.4 Klinične manifestacije karcinoma prostate

V kliniki srečamo štiri oblike raka prostate: klinični, incidentni, latentni in okultni karcinom (5). Tkivo prostate se lahko maligno spremeni v različne tipe primarnih tumorjev, od katerih je večina majhnih in visoko diferenciranih, ki so klinično manj pomembni (22). Primarni tumorji prostate redko povzročijo smrt bolnika, saj je tumor prisoten v nevitalnem organu. Problem so predvsem metastaze. Potrebujemo markerje, ki bi učinkovito ločili med primarnim in razširjenim karcinomom, ali še bolje, ki bi napovedali verjetnost širitve primarnega tumorja (23).

Klinični karcinom zaznamo z digitalnim rektalnim pregledom, pri katerem najdemo zatrditev in nepravilno oblikovanost prostate. Zvišanje serumske koncentracije PSA in pozitivni izvid ultrazvoka prav tako povečata možnost klinične oblike karcinoma prostate. Diagnozo kliničnega karcinoma vedno potrdimo z biopsijo prostate (5).

Incidentni karcinom naključno odkrijemo pri pregledu materiala za histološke preiskave, pri čemer predhodno ne sumimo na karcinom. Pogosto najdemo incidentni karcinom v žlezah, ki so bile odstranjene zaradi hiperplazije (5).

Latentni karcinom prostate je tisti, ki ga naključno odkrijemo po bolnikovi smrti. Karcinom v bolnikovem življenju ni izkazoval nobenih simptomov (5, 22). Je tip karcinoma, ki ponavadi ni smrten (19).

Okultni ali skriti karcinom je klinično pomemben, saj se najprej izrazi šele z metastazami v kosteh ali bližnjih bezgavkah. Ko je stanje boleznj omejeno na primarni karcinom, ni vidnih nikakršnih simptomov. S histološko preiskavo postavimo končno diagnozo (5).

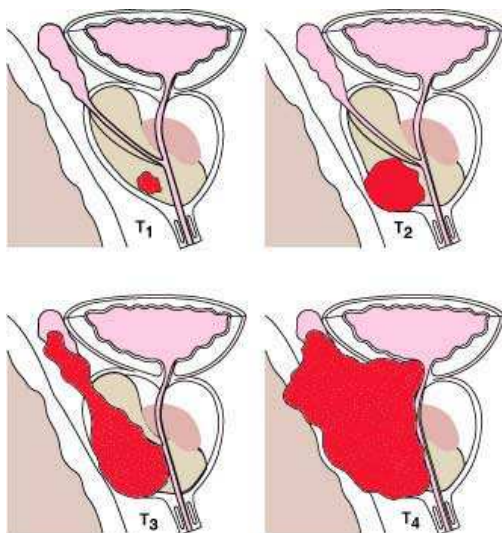
1.2.5 Opredelitev stopnje razširjenosti tumorja (stadij bolezni)

Stopnjo razširjenosti tumorja nasplošno opredelimo s shemo TNM. S »T« opredelimo velikost primarnega tumorja, z »N« razširjenost tumorja na bližnje bezgavke in z »M« prisotnost oddaljenih metastaz. Stadij bolezni najboljše ocenimo pri pregledu tkiva prostate, ki ga pridobimo z radikalno prostatektomijo (5). Za razvoj premaligne latentne oblike do invazivnega karcinoma prostate je potrebnih od 10 do 20 let (24).

Poznamo štiri stopnje razširjenosti primarnega tumorja:

- **pT1** - naključno odkriti karcinom prostate (incidentni karcinom),
- **pT2** - karcinom, ki se nahaja v enem (levem ali desnem) oz. obeh režnjih prostate,
- **pT3** - karcinom, ki je prebil ovojnico prostate in se širi v okolnje tkivo (semenske mešičke), in
- **pT4** - karcinom, ki se širi v sečni mehur, danko, okolnje mišice in proti stenam medenice.

Matastaze karcinoma prostate najdemo najprej v regionalnih bezgavkah (obturatorne, iliakalne) in v kosteh (medenica, hrbtenica, ...), čeprav lahko metastazira skoraj povsod po organizmu (6). V pljučih, jetrih in možganih redko najdemo zasevke karcinoma prostate (5).



Slika 4: Stopnje razširjenosti primarnega tumorja prostate (T1, T2, T3 in T4) (25)

1.2.6 Diagnostika raka prostate

Digitalni rektalni pregled (DRP)

Do sredine leta 1980 je bil digitalni rektalni pregled edina preiskava namenjena diagnostiki raka prostate (26). Danes še vedno velja za temeljno preiskavo na tem področju. Z DRP ocenimo velikost prostate in določene spremembe v njej. Problem testiranja je, da veliko oblik raka ne tipamo, zato lahko pride do diagnostičnih napak (18). Karcinom v periferni coni lahko tipamo, v centralni in prehodni coni pa ne. Poleg tega spremembe tkiva niso vedno maligne, lahko gre tudi za fibrozo, prostatične kamne ali pa vnetni proces (14). Znano je, da ima veliko bolnikov z negativnim DRP povečan volumen prostate ali povečano koncentracijo PSA v serumu. Negativna lastnost testa je tudi slaba napoved stadija bolezni. Ker prihaja do veliko lažno negativnih primerov, testu pripisujemo slabo občutljivost in ga označujemo kot nezanesljivo samostojno diagnostično metodo (26).

Serumska koncentracija PSA

Morebitno vlogo PSA za zgodnje odkrivanje raka prostate so začeli raziskovati po odkritju, da ima večina bolnikov z rakom prostate povišano serumsko koncentracijo PSA (27). Zaradi uvedbe PSA v klinično prakso se je incidenca raka prostate v zgodnjih 1990-ih letih močno povečala (28). Danes je PSA najučinkovitejše sredstvo za zgodnjo diagnostiko raka prostate (26). Višjo serumsko koncentracijo PSA povezujejo z večjo verjetnostjo prisotnosti karcinoma prostate (28). Kljub množični uporabi PSA le ni idealni tumorski marker (29).

Vrednosti PSA so lahko povišane tudi zaradi hiperplastične spremembe tkiva, torej BHP. Hiperplazija je 3-krat bolj prevalentno stanje kot rak prostate (27, 19). 30–50 % bolnikov z BHP ima povišano serumsko koncentracijo PSA (30). PSA je specifični protein za tkivo prostate in ni povišan le v primeru raka, zato ga je bolje označiti kot tkivni marker in ne kot tumorski marker (31, 32). Povišana vrednost PSA je lahko tudi posledica vnetnega procesa, spolne aktivnosti ali pa invazivnih diagnostičnih pregledov (16). Za ponovno merjenje PSA je potrebno počakati 1–2 meseca po histološkem ali rektalnem pregledu (19). Znižane vrednosti PSA v krvi so lahko posledica antibiotične ali protivnetne terapije kroničnega prostatitisa (33).

Prostatni specifični antigen odlikuje visoka občutljivost, saj ima približno 75 % bolnikov z rakom prostate serumske vrednosti nad 4 ng/ml (29). Kljub temu je agresivna oblika raka prisotna tudi pri bolnikih s PSA pod 4 ng/ml; teh je okoli 15 % (16, 28, 34, 35).

Problem PSA je njegova specifičnost (60). Z biopsijo potrjeno bolezen ima samo 25–33 % moških z abnormalno vrednostjo PSA, zato veliko moških prestane nepotrebno biopsijo prostate (8, 29, 36, 37). Uporaba PSA kot samostojnega sredstva za diagnostiko raka prostate zato ni mogoča (28, 38).

Mejna koncentracija PSA, ki odloča o nadaljnji diagnostični obravnavi s histološko analizo, je najpogosteje 4 ng/ml (16, 29). Ker imajo bolniki z vrednostjo PSA manj kot 4 ng/ml pretežno majhne tumorje (69 % primerov) in večjo možnost ozdravitve (94%) kot tisti z vrednostjo PSA več kot 4 ng/ml (70% verjetnost ozdravitve), je za detekcijo potencialno ozdravljive bolezni obveljala meja 4 ng/ml (19). Vendar se v zadnjem času vse bolj uveljavlja mejna vrednost 3 ng/ml (22). Razlogov za to je več. Če upoštevamo klasično mejno vrednost 4 ng/ml, lahko zgrešimo več kot 75 % primerov raka, ki bi ga lahko z biopsijo zaznali. Pri tem bi zgrešili več kot 50 % primerov z nizko stopnjo celične diferenciacije, ki jim predpisujemo najslabšo prognozo (39).

Starejši moški imajo zaradi hiperplazije večji obseg tkiva, zato serumska koncentracija PSA narašča s starostjo (40). Z nižanjem mejne vrednosti PSA v serumu bi večkrat odkrili raka v še ozdravljivem stadiju. Toda v nasprotnem primeru, tj. s povišanjem te vrednosti, torej z izboljšanjem analitske specifičnosti, bi zmanjšali število nepotrebnih biopsij prostate (16, 27, 29).

Uporaba PSA v klinični praksi lahko vodi do diagnostičnih napak. To se zgodi v primeru bolnikov z življenjsko nenevarnimi oblikami raka, ki nikoli ne bi dosegli faze klinične pomembnosti (41). Ti bolniki prestanejo nepotrebne komplikacije zaradi kirurških posegov, biopsij ali obsevanja (10). Najpogostejši komplikaciji po biopsiji prostate sta krvavitev in infekcija (42).

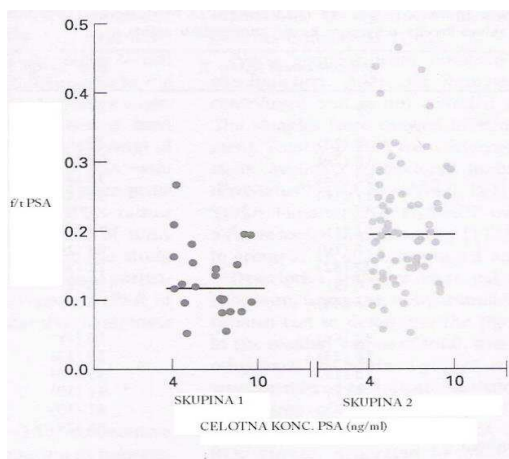
Z namenom izboljšanja specifičnosti PSA so raziskovalci predstavili različne modifikacije določanja proteina v serumu (38). Prvi način izvira iz ugotovitve, da v serumu lahko ločimo več encimsko neaktivnih oblik PSA (43, 44). Najdemo ga v prosti obliki (fPSA) ali vezanega na proteazne inhibitorje (cPSA) (32, 36, 45). Vsoto obeh oblik poda klasični test PSA (45, 46).

V serumu najdemo največ PSA v kompleksu z α 1-antihimotripsinom (ACT), v manjših odstotkih tudi v kompleksu z α 1-antitripsinom in α 2-makroglobulinom (A2M) (11, 31, 36, 44). A2M je zelo velik protein, ki onemogoča pristop protiteles proti PSA, zato kompleksa s klasično ELISO ne moremo detektirati (44). Čeprav v serumu prevladuje kompleks z ACT, predvidevajo, da vezava na A2M predstavlja glavni način eliminacije PSA iz seruma (49). Vsebnost proste oblike v serumu se giblje v območju od 5 do 45 % (11). Med prosto frakcijo prištevamo izoformo BPSA (benigni PSA), ki izvira iz hiperplastične prehodne cone prostate, ter proPSA iz malignih celic periferne cone in predmaligne stopnje karcinoma prostate (PIN) (47). Merjenje izoforme proPSA izboljša detekcijo raka prostate v območju pod 4 ng/ml, saj je izoforma proPSA močnejše povezana z bolj agresivno obliko raka kot druge oblike PSA (38).

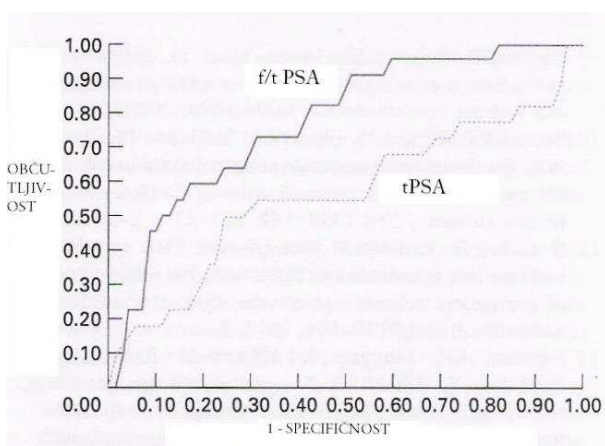
Bolniki z benigno spremenjenim organom so nagnjeni k višjim deležem fPSA kot bolniki z rakom prostate (8). Za ločitev med benigno in maligno obliko bolezni je uporaba merjenja deleža fPSA zato primerna le za bolnike z majhno prostato (manjšo od 30 cm³) (8, 48). Naslednja pomankljivost merjenja deleža fPSA je in vitro nestabilnost pri 4 °C in sobni temperaturi, kar zahteva previdno in skrbno ravnanje z vzorci (34, 48). Vsebnost proste frakcije v serumu pada hitreje od celokupnega PSA tudi pri temperaturi pod -70 °C (49).

Ameriška organizacija za hrano in zdravila (FDA) je odobrila merjenje deleža proste frakcije PSA v klinični praksi z namenom dodatnega testiranja posameznikov s celokupno koncentracijo v območju od 4 do 10 ng/ml. Višji delež proste oblike nakazuje na manjšo možnost za rak prostate in večjo verjetnost za BHP (11). Uporaba mejne vrednosti 25 % fPSA je priporočljiva za bolnike z celokupnim PSA med 4 in 10 ng/ml (50). Velik napredek v specifičnosti izkazuje tudi merjenje koncentracije PSA v kompleksu. Vezana oblika PSA izkazuje visoko stabilnost in detekcijo slabo diferenciranih tumorjev (48, 51, 52).

Kako dobro tumorski marker loči skupino rakavih bolnikov od zdravih preiskovancev izvemo iz ROC krivulje (53). ROC krivulja prikazuje razmerje med deležem resnično pozitivnih primerov in deležem lažno pozitivnih primerov pri različnih mejnih vrednostih klasifikatorja. Krivuljo dobimo tako, da pri vsaki mejni vrednosti določimo število pravilno pozitivnih (občutljivost) in število lažno pozitivnih primerov (1-specifičnost) (54).



Graf 1: Vrednosti za f/t PSA v skupini 1 (rak prostate) in v skupini 2 (BHP) glede na vrednosti celotne koncentracije PSA (31)



Graf 2: Krivulja ROC, ki primerja uspešnost tPSA in f/t PSA v razlikovanju med zdravimi posamezniki in bolniki z rakom prostate (31)

Drugi poskus izboljšanja uspešnosti PSA temelji na novih analitskih parametrih, ki upoštevajo volumen prostate, kinetiko PSA in starost pacientov (18, 29). Ker bolniki z rakom prostate izločajo več PSA na enoto volumna prostate kot bolniki s hiperplazijo, so uvedli parameter gostota PSA (PSAD) (8). Definiramo ga kot kvocient med serumsko koncentracijo PSA in volumnom prostate (28). 1 g hiperplastičnega tkiva dvigne PSA za približno 0,3 ng/ml, a ista količina rakavega tkiva za 3,5 ng/ml (55). Vrednost parametra je torej višja pri bolnikih z rakom (8).

Večina volumna prostate se poveča na račun prehodne oziroma tranzicijske cone prostate. Uspešnost PSAD lahko izboljšamo s tem, če upoštevamo le omenjeni del žleze. Gostoto

PSA iz tranzicijske cone (PSAD-TZ) lahko določimo le pri moških s prostato, večjo od 30 cm³, saj je volumen cone v primeru majhnih žlez težko določljiv (34, 48, 56). Za izračun gostote moramo torej pridobiti podatek o volumnu žleze. Ker volumen prostate izmerimo s pomočjo invazivnega ultrazvoka, ni pričakovati, da bo kadar koli v klinični praksi meritev PSAD-TZ zamenjala uveljavljene diagnostične metode (8).

Naslednja dva parametra sta kinetične narave. Prvega imenujemo PSAV (*PSA velocity*), ki predstavlja letni dvig koncentracije PSA v serumu (22). Kinetične narave je tudi PSA-DT (*PSA doubling time*), torej čas podvojitve koncentracije PSA v serumu (35). V primeru hitre podvojitve PSA v krvi (v roku 2 let), sklepamo na bolj agresivne oblike raka (29). Uporabnost kinetičnih parametrov vidimo predvsem v spremljanju moških s PSA pod 4 ng/ml, ki biopsije ne potrebujejo urgentno (34).

Optimizacija referenčnih vrednosti v posameznih starostnih skupinah prav tako ni dosegla najboljših rezultatov. Referenčna vrednost za moške v starostni skupini 70–80 let naj bi po nekaterih merilih dosegala 6,5 ng/ml PSA (27). Veliko karcinomov pri tej koncentraciji, ki jih ne bi detektirali, odražajo že življenjsko ogrožujoče stanje, zato tak način optimizacije testiranja PSA ni najprimernejši (29).

Sklepamo, da je uporaba PSA smiselna le v kombinaciji z ostalimi diagnostičnimi metodami, rektalnim pregledom in ultrazvokom, toda še vedno težko ločimo maligno obliko bolezni od benigne (57). V primeru kombiniranja teh metod povečamo občutljivost detekcije raka (28). Zaradi nezanesljivosti metod se veliko bolnikov napoti na biopsijo prostate (58). Čeprav je histološka analiza potrebna za diagnozo raka prostate, bi se morali tej invazivni in dragi metodi izogniti moški z manjšo možnostjo razvoja omenjene bolezni (32).

Predoperativna vrednost PSA je poleg starosti, klinične faze in ocene diferenciranosti tumorja predvsem dober prognostični indikator biokemičnega recidiva po operativni odstranitvi prostate (59). Poleg tega je uspešen kazalec progresije bolezni, saj porast PSA v serumu opazimo pred klinično vidnim napredovanjem bolezni (20).

Rektalni pregled in merjenje serumske koncentracije PSA sta danes prvi in osnovni preiskavi pri sumu na rak prostate. Ob patoloških testih nadaljujemo z transrektalnim ultrazvokom in biopsijo prostate (16).

Transrektalni ultrazvok (TRUZ)

Transrektalni ultrazvok nam omogoča oceniti velikost oziroma volumen prostate (49). Vidimo lahko rakavo tkivo, ki pri 71,3 % bolnikov predstavlja nepravilno hipoehogeno področje v periferni coni, pri 27,4 % primerov izoehogeno področje ter hiperehogeno pri 1,3 % bolnikov (18). Hipoehogeno področje je lahko tudi posledica vnetja ali drugih sprememb v tkivu (14). Metoda je slabo občutljiva in specifična za dokazovanje lokalno napredovanega raka prostate (18, 19).

Biopsija prostate

Histološka analiza se izvaja pod nadzorom transrektalnega ultrazvoka (18). Običajno se jemlje 6 vzorcev iz različnih delov prostate, kar predstavlja standardno sekstantno biopsijo. Biopsija detektira od 20 do 35 % bolnikov (15). Pri sekstantni biopsiji jemljemo vzorce le iz perifernega območja brez vključitve prehodnega območja, kjer se razvije do 25 % raka (18). Veliko pacientov je kljub negativni biopsiji napoteni na ponovni pregled. Gre predvsem za bolnike s pozitivnim testom DRP ali PSA, pri katerih gre še vedno za sum na rak prostate tudi zaradi histoloških sprememb tkiva, kot je predmaligna stopnja raka prostate (15).

Najpogostejši histološki tip raka prostate je adenokarcinom (več kot 95 %). Za oceno stopnje diferenciacije karcinoma prostate uporabljamo Gleasonov sistem, ki razvršča karcinom v pet razredov. V zadnji Gleasonov razred sodijo najmanj diferencirani karcinomi z agresivnejšim tipom in slabšo prognozo (5). Stopnjo diferenciranosti opredelimo z vsoto dveh biopsijskih vzorcev, ki sta po obsegu največja. Vzorca predstavljata oceno po Gleasonu z vrednostmi 2–10 (5, 60). Dobro diferencirani karcinomi so ocenjeni z 2–4, zmerno z 5–7 in slabo diferencirani z 8–10 (5). Histološka stopnja oziroma ocena po Gleasonu je najmočnejši samostojni prognostični marker raka prostate (19).

Prostatična intraepitelijska neoplazija (PIN)

Prostatična intraepitelijska neoplazija deli mnogo histopatoloških, morfoloških in genetskih lastnosti z rakom prostate, zato jo označujemo kot predmaligno stopnjo in glavni prekursor invazivnega karcinoma prostate (61, 62). Predstavlja vmesno stopnjo med normalnim in malignim prostatičnim epitelijem (17). PIN je morfološko spremenjen žlezni epitelij. Kaže se kot intraluminarna proliferacija sekretornih celic z različno stopnjo

jedrske anaplazije ter s končnim stanjšanjem plasti bazalnih celic (5, 62). Majhne spremembe žleznega epitelija označimo kot PIN nizke stopnje (*low grade*), velike spremembe pa PIN visoke stopnje (*high grade*), kjer gre že za adenokarcinom (5).

PIN lahko odkrijemo le z mikroskopom, zato ga največkrat srečamo v biopsijskih vzorcih, poslanih na histološko preiskavo (5, 17). Služi nam kot dober prognostični marker (17).

1.2.7 Zdravljenje raka prostate

Lokalno omejeni rak prostate zdravimo s kirurško odstranitvijo prostate, obsevanjem in hormonsko terapijo.

Lokalno napredovani rak prostate, razširjen v področne bezgavke, običajno zdravimo s hormonsko terapijo, ki ji dodamo še tele- ali brahiradioterapijo.

Napredovani rak prostate se v prvi vrsti širi v bezgavke ob velikih žilah (retroperitonealne bezgavke) in kosti. Ponavadi pristopimo s popolno hormonsko blokado z LHRH agonisti in antiandrogeni (14).

Radikalna prostatektomija

Uspešno zdravljenje bolnikov z rakom prostate je mogoče, če se bolezen odkrije, ko je omejena še na primarni organ (63). Operativna odstranitev prostate, oziroma radikalna prostatektomija, je glede na dolgoročne rezultate trenutno najboljša metoda zdravljenja (16, 63). Zdravljenje z radikalno prostatektomijo je indicirano za bolnike, pri katerih je pričakovana življenjska doba več kot 10 let in imajo lokalno omejeni rak prostate (16, 64). Po operacijskem posegu se bolnikom kontrolira vrednost PSA po treh, šestih in dvanajstih mesecih, nato pa enkrat letno, če ni prisotnih kliničnih znakov napredovanja bolezni (63). Po posegu lahko nastanejo določeni zapleti, kot so erektilna disfunkcija, urinska inkontinenca, zožitev na mestu anastomoze ali biokemični recidiv, o katerem govorimo, kadar PSA po operaciji naraste nad 0,2 ng/ml. Do biokemičnega recidiva pride ponavadi v prvih dveh letih po operaciji (64).

Teleradioterapija & brahiradioterapija

Zunanje obsevanje prostate (teleradioterapijo) izvajamo 6–8 tednov, pri čemer povečamo učinkovitost zdravljenja, če obsevanje kombiniramo s hormonskimi pripravki (14).

Intersticijsko radioterapijo oziroma brahiradiotrapijo izvajamo po končanem zunanjem obsevanju. Uporabljajo se implantanti radioaktivnih izotopov, kot so iridij-92, paladij-103 in jod-125 (16).

Hormonsko zdravljenje

Namen hormonskega zdravljenja je znižanje koncentracije testosterona pod 50 ng/dl (14). Uporabljajo se gonadotropin sproščujoči hormoni (GnRH), znani kot agonisti receptorjev GnRH, ter antiandrogeni. Agonista GnRH sta buserelin in goserelin (16). Omenjeni učinkovini aktivirata sproščanje LH in FSH iz hipofize. Izločanje hormonov se po določenem času iztroši, zato se posledično zmanjša sinteza testosterona (14). Med antiandrogene prištevamo bikalutamid in flutamid, ki sta oba nesteroidne narave (16).

1.3 TUMORSKI MARKERJI

V zadnjih letih so se raziskave raka usmerile predvsem na odkritje novih tumorskih markerjev, ki bi bili uporabni v klinični praksi in bi pripomogli k zgodnjemu odkrivanju raka (10). Merjenje tovrstnih označevalcev v serumu bolnikov je danes eden izmed najhitreje razvijajočih se področij laboratorijske biomedicine (65).

Tumorski marker je bil prvič opisan 160 let nazaj, ko je kemik Henry Bence Jones v urinu pacientov z multiplim mielomom opazil prisotnost nenormalnih proteinov. Tumorske markerje opišemo kot produkte malignih celic ali snovi, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom malignih celic (66, 67). Uporabni so za diagnostiko raka, spremljanje napredovanja tumorske mase, napovedovanje prognoze in za spremljanje uspešnosti terapije (68).

Idealni tumorski marker predstavlja protein, ki ga tvorijo le maligni tumorji ter je značilen za določen organ in tip tumorja. Lahko ga dokažemo pri vseh bolnikih z istim tipom tumorja, tvori se v zadostnih količinah že na začetku razvoja maligne bolezni in njegove serumske koncentracije odražajo velikost maligno spremenjenega tkiva (66).

Kljub mnogim raziskavam na tem področju jih v klinični praksi uporabljamo le nekaj izmed njih (65). Razlog je predvsem v pomanjkanju njihove specifičnosti in povečane tvorbe v fizioloških in nemalignih stanjih. K lažno pozitivnim rezultatom lahko prispevajo vnetni procesi, benigni tumorji, jetrne bolezni, obsežna tumorska nekroza, posledice diagnostičnih pregledov in terapij, nosečnost ter motnje v delovanju ledvic. Lažno

negativne rezultate lahko povzroči slaba prekrvitev tumorja, nastajanje imunskih kompleksov s tumorskimi antigeni ali hitro izločanje tumorskih antigenov iz seruma (66).

Danes znani tumorski označevalci so manj primerni za odkrivanje maligne spremembe, toda so potencialno uporabni za paciente z znano diagnozo za napoved njihove prognoze. V pomoč so pri izbiri načina zdravljenja, služijo za napoved terapevtskih izidov in imajo velik pomen pri zgodnjem odkrivanju ponovnega izbruha bolezni (65, 66).

Klinično uporabni označevalci maligne transformacije so α -fetoprotein (AFP) za nadzor bolnikov s hepatocelularnim karcinomom, karcinoembrionalni antigen (CEA) za spremljanje pacientov z diagnosticiranim rakom kolona in rektuma, CA 125 za kontrolo terapije pri pacientkah z rakom na jajčnikih in HCG za nadzor pacientov s trofoblastnimi in neseminomskimi germinalnimi tumorji. Pri raku dojke estrogenski receptorji služijo za napoved odgovora na hormonsko terapijo, HER-2 pa omogoča identifikacijo bolnic, ki so primerne za zdravljenje s trastuzumabom (65). Toda največjo uporabnost izraža prostatni specifični antigen (32).

Prvi tumorski marker raka prostate je bil encim, imenovan kislja fosfataza. Serumska kislja fosfataza lahko izvira iz različnih organov od kosti, prostate, jeter, ledvic do eritrocitov. Bolezni drugih organov torej lahko povzročijo povišano vrednost encima v krvi, kar vodi v slabo specifičnost analita. Iz leta 1966 so znani prvi zapisi o gama-semينو-proteinu, proteinu semenske tekočine, ki je danes znan pod imenom prostatni specifični antigen (69). Leta 1980 so prvič dokumentirali prisotnost povišane koncentracije PSA v serumu bolnikov z rakom prostate (68). V letu 1994 je agencija FDA zabeležila odobritev uporabe PSA za zgodnjo detekcijo raka prostate (70).

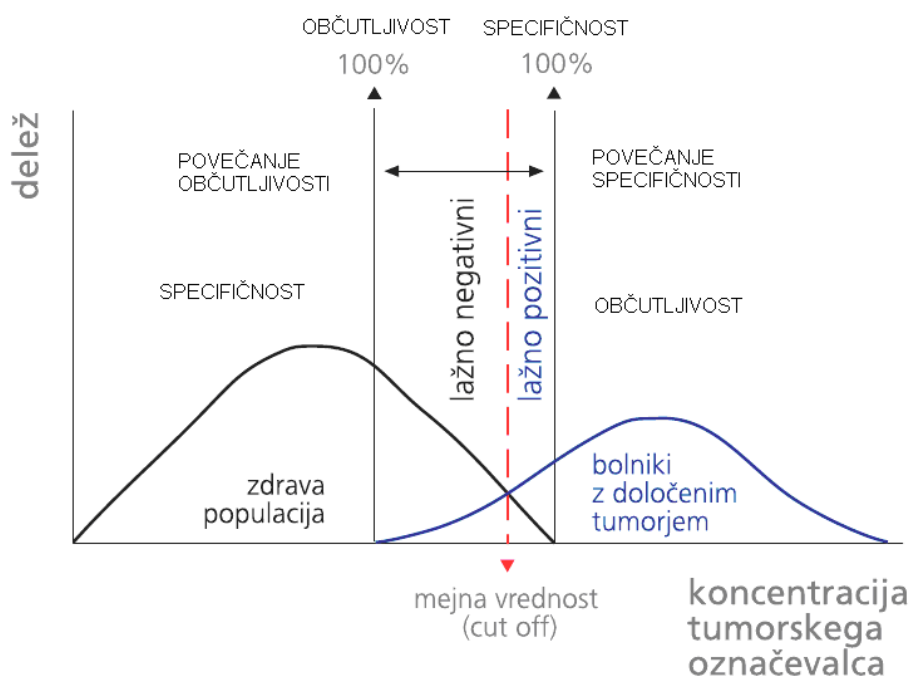
Vlogo in uporabnost posameznega tumorskega označevalca ter metode za določeno vrsto rakave bolezni opredelimo s statističnima pojmom občutljivost in specifičnost (68).

Občutljivost testa je delež bolnikov z določenim tumorjem, ki imajo pozitivni test.

Specifičnost testa predstavlja delež zdravih pacientov z negativnim izvidom (66).

	pozitivni test	negativni test
bolni	A	B
zdravi	C	D
občutljivost = $A/(A + B)$; specifičnost = $D/(C + D)$		

Preglednica 1: Enačbi za izračun specifičnosti in občutljivosti testa (39)



Graf 3: Prikaz vpliva mejne vrednosti na specifičnost in občutljivost analita (66)

Za optimalno zdravljenje raka potrebujemo zanesljive prognozične in predikcijske markerje. Prognozični markerji so faktorji, ki napovejo končni bolezenski izid v odsotnosti terapije. Predikcijski markerji so povezani z odgovorom ali rezistenco na določeno terapijo. Tradicionalni prognozični faktorji za maligno bolezen so velikost tumorja, stadij bolezni in število metastaz v regionalnih bezgavkah (65).

Tradicionalni testi za vrednotenje tumorskih markerjev so ELISA – tip testov za serumske kazalce in imunohistokemijske metode za tkivne označevalce maligne transformacije (65).

1.3.1 Alfa-fetoprotein (AFP)

Alfa-fetoprotein je serumski glikoprotein, ki spada v skupino alfa1-globulinov (71). Kot prvi onkofetalni antigen je bil objavljen leta 1963, ko so ga odkrili v serumu miši s hepatocelularnim karcinomom (66, 72). Onkofetalni proteini so proteini, ki normalno nastajajo med embrionalnim razvojem, toda pri odraslih ljudeh je njihova tvorba omejena ali zavrta. Povečane koncentracije teh proteinov pri odraslih so posledica ponovne aktivacije določenih genov, ki nadzorujejo celično rast in so neposredno povezani z malignim procesom (66). Do ponovne ekspresije za AFP pride zaradi celične proliferacije hepatocitov, ki je posledica okvare ali poškodbe jeter (73).

Velikost proteina je približno 70 kDa s polipeptidno verigo dolgo 590 aminokislinskih ostankov (74). Razpolovni čas proteina je 5 dni (66). Na začetku embrionalnega razvoja se sinteza vrši v rumenjakovem mehurčku, pozneje se v manjšini sintetizira v epitelnih celicah gastrointestinalnega trakta, a pretežno v jetrih fetusa, kjer se formirajo serumski proteini (71). Po rojstvu otroka koncentracija proteina v materinem krvnem obtoku strmo upade. V serumu novorojenčka se normalne vrednosti vzpostavijo približno v dveh mesecih po rojstvu (75). V tem času se AFP skoraj popolnoma nadomesti s serumskim albuminom (74). Znana je velika podobnost v strukturi in delovanju med AFP in humanim serumskim albuminom (HSA). AFP zato poimenujemo tudi embrionalni albumin (76). Molekuli sta si namreč zelo podobni v dolžini polipeptidne verige, v aminokislinskem zaporedju, v molekulski masi in tudi izoelektrični točki (71).

AFP je povezan z mehanizmi rasti, celične diferenciacije, regeneracije in apoptoze v procesu maligne transformacije in ontogenetskega razvoja (77). Opravlja veliko pomembnih bioloških funkcij, med katerimi prevladuje transportna funkcija. Prenaša molekule, kot so polinenasičene maščobne kisline, estrogeni, bilirubin, tiroksin, triptofan, Cu^{2+} in Ni^{2+} ioni (74, 78). Opisujejo ga kot potencialni rastni faktor, ki omogoča proliferacijo celic hepatokarcinoma. Njegovi učinki na rast naj bi bili posredovani preko specifičnih membranskih receptorjev sklopljenih s transmembransko signalno transdukcijo preko poti cikličnega AMP, ki aktivira protein kinazo A, in intracelularnega kalcija. Prek teh poti se regulira ekspresija onkogenov (77).

Nekatere teorije govorijo o AFP kot o imunosupresivu, ki zaščiti zarodek pred imunskim odzivom matere (73). Podobna slika se pokaže pri pacientih z rakom (74). Zavira namreč proliferacijo limfocitov, aktivnost limfocitov T in naravnih celic ubijalk ter povzroča

apoptozo limfocitov in dendritičnih celic. Inducira tudi angiogenezo z aktivacijo angiogenih faktorjev, kot je vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF) (75).

Med nosečnostjo lahko pride do odstopanj od normalne koncentracije AFP v materinem serumu. To pogosto nakazuje na zaplete, zato je AFP tudi dober kazalec stanja zarodka. Pri Downovem sindromu pride do pomanjkanja proteina v materinem serumu, medtem ko so zvišane koncentracije proteina indikatorji za različne anomalije ploda (79).

Povišane serumske koncentracije (nad 10 ng/ml) pri odraslih zasledimo ob raznih jetrnih boleznih, kot je akutni virusni hepatitis, ciroza ali obstruktivni ikterus. Tudi ob bolezenskih stanjih, kot sta cistična fibroza in kongenitalna motnja, ali pri nekaterih rakavih stanjih, kot so rak trebušne slinavke, pljuč, kolona in želodca, lahko opazimo povišan AFP (80, 81). Povišana vrednost je lahko tudi posledica redke dedne avtosomno dominantne bolezni, za katero so značilne trajno povišane koncentracije proteina v krvi (80).

V klinični praksi ima poseben pomen za spremljanje bolnikov s hepatocelularnim karcinomom (predstavlja 95–100% občutljivost in specifičnost), kjer vrednosti nad 1200 ng/ml nakazujejo na primarni jetrni karcinom. Uporablja se tudi za nadzor bolnikov z neseminomskimi germinalnimi tumorji (66).

1.3.2 Receptor za alfa-fetoprotein (RECAF)

RECAF je receptor, ki omogoča privzem alfa-fetoproteina v fetalne in tumorske celice (82). Igra pomembno vlogo pri razvoju celic zarodka, saj omogoča dostavo polinenasičenih maščobnih kislin (83). Normalno se izraža v celicah zarodka skozi embrionalni razvoj, toda ne v zdravih celicah odraslih ljudi (53). V večini tumorskih tkiv se začne ponovno izražati, zato ga uvrščamo v skupino onkofetalnih biomarkerjev, med katere prištevamo tudi AFP in CEA (84). Privzem AFP v zarodne celice poteka v večini organov in tkiv, zato ga najdemo v vseh tipih maligne bolezni, kot so rak dojk, debelega črevesja, jajčnikov, prostate in pljuč (72, 84, 85).

Raziskave o obstoju receptorsko-ligandskega sistema segajo še v obdobje pred letom 1981. Takrat so potrdili prisotnost dveh AFP bogatih ultracentrifugalnih frakcij, in sicer na nezrelah podganjih materničnih celicah. Prva manjša frakcija je frakcija 4S, ki pripada AFP, saj je bila pozitivna na testiranje s protitelesi anti-AFP. Druga je frakcija 8S, torej kompleks AFP-receptor. Pri tej frakciji je imunološka detekcija pozitivna le s pretvorbo v 4S obliko po dodatku 0,4 M KCl (85).

Iz leta 1984 so znani prvi zapisi o privzemu AFP v mišje tumorske celice (86). Vstop AFP v maligne celice poteka na osnovi receptorsko posredovane endocitoze (87). Stopnja celične diferenciacije regulira privzem AFP in posledično povečano ekspresijo receptorja. Nediferencirane niti popolnoma diferencirane celice nimajo možnosti privzema AFP (87, 88). Tumorske celice so slabo diferencirane, zato v njih pride do ponovne ekspresije receptorja (72, 85). Ko določena celica dozori in doseže visoko stopnjo diferenciacije, ne potrebuje več privzema AFP, čeprav je ta v visokih koncentracijah prisoten v serumu (83).

Nadalje so znani zapisi o privzemu AFP v razne tipe neoplazmatskih celic, kot so celice raka dojke, neuroblastoma, hepatoma in limfoma (87, 88, 89). Leta 1984 je bil predstavljen privzem AFP v celice tumorja dojke (MCF-7) in s tem dokazan obstoj receptorja za AFP. Raziskava je pokazala prisotnost vsaj dveh vezavnih mest za AFP (90). Študija na mišjih celicah limfomih T leto kasneje nakazuje na prisotnost treh vezavnih mest (91). Receptor je bil prvič delno izoliran iz celic monocitov leta 1992. Membranski receptor monocitov je bil prikazan kot polipeptid z molekularno maso 65 kDa, pridobljeno z metodo SDS-PAGE in avtoradiografijo (92). Pridobitev prvega monoklonskega

protitelesa proti AFP-R na membranah celic adenokarcinoma dojke je bila v literaturi opisana leta 1993. Takrat je bil receptor prvič predstavljen kot potencialni onkofetalni tumorski marker univerzalnih razsežnosti (89). Leta 1997 je bil izoliran iz embrionalnih celic in celic rakavega tkiva dojke. Molekula je sestavljala tri nekovalentno vezane podenote, dve podobne velikosti in eno večjo (92). Večji fragment receptorja bi lahko bili kompleksi z antireceptorskimi avtoprotitelesi (85). Kompleks s tremi podenotami in afinitetno konstanto od 2 do 4×10^{-10} , ki naj bi bil lokaliziran na površini embrionalnih in tumorskih celic, izpolnjuje tudi vse kriterije za AFP receptor. Natančnejša identifikacija trimernega kompleksa do sedaj še ni bila ovrednotena (89).

Raziskave internalizacije so pripeljale do koncepta o avtokrinem AFP/AFP-receptorskem kompleksu na celicah monocitov in T-limfocitov. Proces stimulacije rasti je bil potrjen tudi v malignih celicah z endocitolitskim vnosom lipoproteinov in maščobnih kislin v celice. Pri zdravih osebah je nivo AFP nizek, a dovolj visok, da aktivira avtokrini proces v mitotično aktivnih celicah (89).

RECAF torej ni samo ena molekula. Vsebuje dve glavni membranski frakciji (18 in 31 kDa) in dve topni citoplazemski komponenti (50 in 62/67 kDa-dimer) (92, 93). Vse frakcije vežejo AFP (94). Večina benignih tumorjev je RECAF negativnih, kar je prednostno pri diagnostiki raka prostate, saj je vrednost PSA zvišana tudi v primeru benigne spremembe prostate (82).

Odkritje receptorja za AFP je ponudilo nove možnosti za detekcijo raka (85). Z radioaktivnim sredstvom lahko označimo AFP in tako spremljamo njegovo akumulacijo v tumorskih celicah ter vizualno odkrijemo, kje se rakava področja nahajajo (membranske frakcije proteina) (95). Ker je privzem AFP v celico pogojen s celično diferenciacijo, je na mestu vprašanje, ali se radiaktivnost kopiči tudi v zdravih nediferenciranih celicah, kot so celice kostnega mozga. Za izključitev te možnosti so ^{131}I -AFP injicirali mišim glede na njihovo maso. Pri teh miših ni bilo opaziti nobenih abnormalnosti in tudi naslednje generacije potomcev so bile zdrave (85).

Detekcija z označenim AFP prinaša določene pomankljivosti. Radioaktivno označeni protein ima enako oziroma manjšo afiniteto do receptorja kot nativni protein. Manjša afinitetna konstanta ima za posledico nižji odstotek vezave na receptor. Poleg tega je očiščeni humani AFP težko pridobiti v velikih količinah. Zaradi vseh naštetih slabosti predstavljajo obetajočo se alternativo monoklonska protitelesa proti receptorju (85).

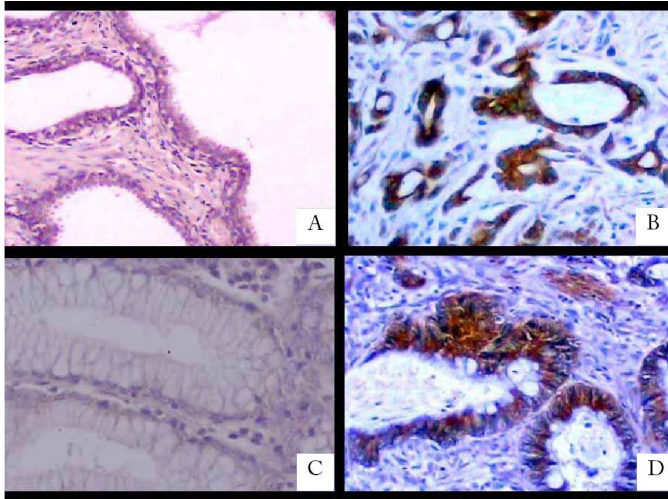
Receptor je uporaben v že prej opisani tumorski scintigrafiji (membranske frakcije proteina) in kot širokospektralni tumorski označevalec (topne citoplazemske frakcije). Zaradi visoke specifičnosti in občutljivosti je primeren kandidat za rutinske presejalne teste, saj le z enim testom prinaša minimalne stroške (82, 83, 85).

Histološka detekcija

Prva razvita metoda določanja receptorja temelji na humanem AFP, konjugiranem z encimom (hrenova peroksidaza), ki se veže na receptor. Ta metoda, ki jo izvajamo pod mikroskopom, je zaščitena pod imenom **Histo-RECAF** in odobrena s strani FDA (Slika 5). Dodatek substrata (diaminobenzidin) vodi do rjavega obarjanja malignih celic (Slika 6). Metoda je primerna za iskanje metastaz v limfnih vozličih in za histološki pregled biopsijskega tkiva. Uporabna je tudi za detekcijo tumorja ščitnice, ki ga z biopsijo težko potrdimo. Večina malignih tumorjev je pozitivnih, normalna in benigna tkiva so skorajda vsa negativna (82). S to metodo zdravniki lažje določijo diagnozo ter ocenijo morfologijo in gostoto malignih celic (96). Druga metoda, imenovana **Cryo-RECAF**, še ni bila odobrena s strani FDA, zato se uporablja le v raziskovalne namene. Metoda je namenjena predvsem kirurgom kot pomoč med operacijo. Pogosto ni jasno, ali so celice benigne ali maligne, zato kirurgom omogoča preiskavo tkiva, medtem ko je pacient pod anestezijo (82, 96).



Slika 5: Set Histo-RECAF (96)



Slika 6: (A) Različna tkiva, obarvana s Histo-RECAF, BHP, 40x; (B) adenokarcinom prostate 200x; (C) zdravo debelo črevo, 200x; (D) rak debelega črevesja, 100x (82)

Serumski testi

Topne frakcije receptorja se sproščajo iz rakavih celic aktivno ali po celični smrti, kar nam omogoča, da jih v serumu določamo z metodo kompetitivne radioimunske tehnike (RIA) s poliklonskimi zajčjimi protitelesi proti topnim frakcijam RECAF (53, 82). Obstajata še dve metodi za merjenje koncentracije RECAF-a v serumu, in sicer kemiluminiscenčni imunski test (CIA) ter encimsko imunski test (ELISA) (97, 98).

Z uporabo imunohistološkega testa lahko detektiramo več kot 90 % raka pljuč in dojke, ki sta prevladujoča predstavnika te bolezni pri obeh spolih (82). Študije nakazujejo na to, da je specifičnost in občutljivost analita visoka tako v poznem, kot tudi v zgodnjem stadiju bolezni. To nam omogoča zgodnjo detekcijo in večjo možnost ozdravitve. Povišana serumska koncentracija receptorja lahko pomeni, da gre za rakavo obolenje, toda nič nam ne pove o tipu in lokaciji malignega tumorja. Za lažjo opredelitev bolezni je smiselno splošni tumorski marker RECAF uporabiti v kombinaciji s specifičnimi tkivnimi označevalci, kot so PSA za rak prostate ali CA 125 za rak jajčnikov (82, 83).

Prednost RECAF-a pred PSA je tudi v tem, da starost ne vpliva na nivo RECAF-a v serumu. Za PSA je znano, da z napredovano starostjo v serumu narašča (99).

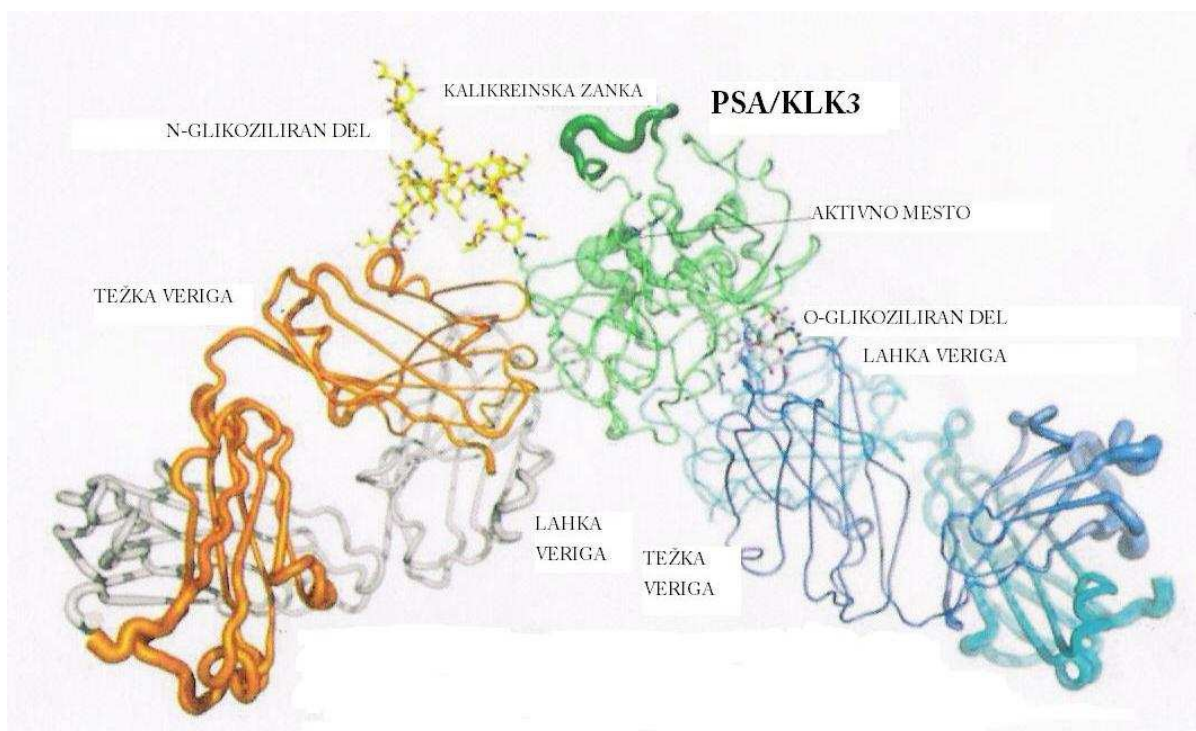
Najboljše orožje proti bolezni današnjega časa, kot je rak, je zgodnja detekcija bolezni (99). Poznani tumorski markerji, kot so CEA in PSA, zaznajo specifičen tip raka, kot sta rak debelega črevesja in prostate. Ker RECAF najdemo skoraj v vseh tipih malignih tumorjev, ga lahko apliciramo na večjo populacijo bolnikov. Pri bolnikih z znano

diagnozo lahko z njegovo uporabo spremljamo uspešnost terapije oziroma pravočasno zaznamo ponovitev bolezni (84).

1.3.3 Prostatni specifični antigen (PSA)

Prostatni specifični antigen ali kalikrein 3 je glikoprotein z velikostjo 34 kDa, ki je sestavljen iz 237 aminokislinskih ostankov (40, 44, 100). Uvrščamo ga v gensko družino kalikreinov. Kalikreini so skupina serinskih proteaz, ki cepijo peptidne vezi proteinov (44). PSA je himotripsinu podobna serinska proteaza s tipično triado His-Asp-Ser in katalitično domeno, podobno ostalim kalikreinom (100).

Prvotno se protein nahaja v obliki *pre-pro-PSA*, ki se modificira v endoplazmatskem retikulumu do *pro-PSA*, neaktivnega prekursorja PSA (96). Njegovo delovanje aktivira humani glandularni kalikrein 2 (HK2), ki ima 80% sekvenčno homologijo s PSA (48, 100). Dokazano je bilo, da se ekspresija za HK2 močno poveča v prisotnosti metastaz in med pretvorbo benignega prostatičnega epitelijskega v primarni rak prostate (48).



Slika 7: Strukturna formula PSA (100)

Primarna funkcija PSA je utekočinjenje koagulirane semenske tekočine za neovirano gibljivost semenčic (52). Najpogostejša substrata za PSA sta *semenogelin 1* (Sg1) in *semenogelin 2* (Sg2), ki nastajata v semenskem mešičku. Sg1 in Sg2 omogočata pripravo specifičnih substratov za merjenje encimske aktivnosti PSA v telesnih tekočinah (44).

PSA se izloča iz epitelnih celic normalnega, benignega in malignega tkiva prostate. Večino proteina producira prehodna cona prostate (101). Razvoj nenormalne žlezne strukture zaradi vnetja ali displazije vodi do izločanja PSA skozi področje vezivnih celic v vaskularni sistem. Normalno tkivo prostate izloča PSA direktno v zbiralne kanale, toda v nasprotju z njim ga maligne celice izločajo tako v zbiralne kanale, kot tudi v predel vezivnih celic (44).

PSA je najboljši tumorski marker, ki je bil kadar koli uporabljen za detekcijo raka prostate. Serumski test PSA je zadnje desetletje široko uporaben in je prinesel dramatičen napredek pri zgodnji detekciji bolezni. Vrednost PSA se v krvi zmanjša na minimalno vrednost po kirurški odstranitvi prostate, radikalni prostatektomiji ali po zdravljenju z obsevanjem (10). Razpolovni čas proteina je 2–3 dni (57, 102).

Normalno je vrednost PSA v serumu nizka, referenčne vrednosti se gibljejo 0–4 ng/ml (103). Povišana vrednost PSA predstavlja sum na rak prostate, a kljub temu zaradi slabe specifičnosti analita klinična diagnostika še vedno temelji na patohistološkem pregledu tkiva (10).

Kljub množični uporabi PSA v klinični praksi nam še vedno primanjkuje uporabnih diagnostičnih markerjev za večino ostalih tipov raka. Potrebujemo nove visoko občutljive in specifične tumorske markerje, ki bi izboljšali diagnostiko vseh tipov rakave bolezni (29).

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je statistično oceniti klinično uporabnost novega tumorskega označevalca, receptorja za alfa-fetoprotein (RECAF), v diagnostiki raka prostate. Izmerili bomo koncentracijo omenjenega markerja z metodo kemiluminiscence (CIA).

V raziskavo bomo vključili skupino moških bolnikov, ki so prišli v urološko ambulanto UKC Ljubljana zaradi težav s prostato. To skupino bolnikov smo na osnovi histološke diagnostike razdelili naprej v dve skupini. Prva skupina so bolniki s potrjeno diagnozo raka prostate, druga skupina pa vsi ostali, torej z benigno spremembo tkiva, vnetjem, atrofično spremembo ali predmaligno stopnjo raka prostate.

Rezultate bomo primerjali s klasičnim tumorskim označevalcem raka prostate PSA in njegovo prosto frakcijo. Na podlagi pridobljenih podatkov bomo izračunali specifičnost in občutljivost receptorja za AFP. S programom SPSS bomo opravili statistično analizo podatkov, na osnovi katere bomo na koncu ovrednotili klinično uporabnost novega tumorskega označevalca.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE RECEPTORJA ZA AFP (RECAF)

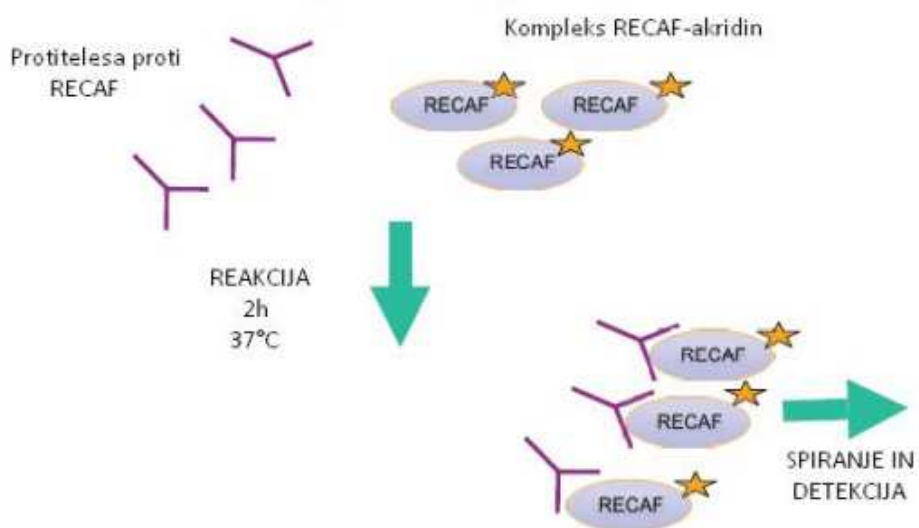
Serumski test CIA RECAF proizvajalca BioCurex je kompetitivni test na trdnem nosilcu za detekcijo receptorja za AFP v serumu (104).

3.1.1 Princip metode

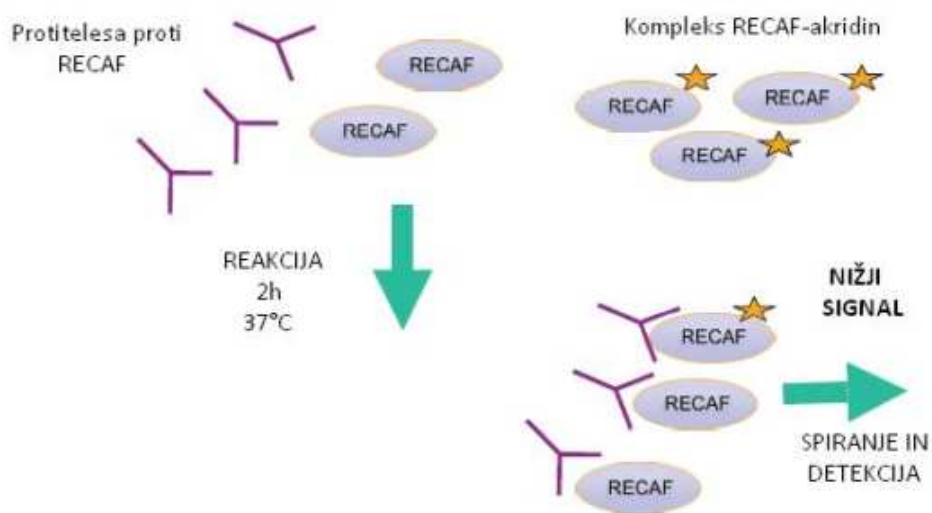
Serumski test RECAF bazira na principu kemiluminiscence (104). Kemiluminiscenca je emisija svetlobe kot posledica kemične reakcije. Pri reakciji nastane vmesni vzbujeni produkt, ki po prehodu v osnovno stanje oddaja foton določene valovne dolžine (105). V našem primeru merimo pri valovni dolžini 405 nm (104).

Pri izvedbi uporabljamo sintetične fragmente proti antigenski determinanti na intaktni molekuli RECAF-a, ki so imobilizirani na mikrotitrski ploščici. Količina protiteles, ki je vezana na trdnem nosilcu je znana. Za vezavna mesta na protitelesih tekmuje RECAF iz serumskega vzorca z raztopino znane koncentracije konjugata RECAF-akridin (ACR-RECAF) (104).

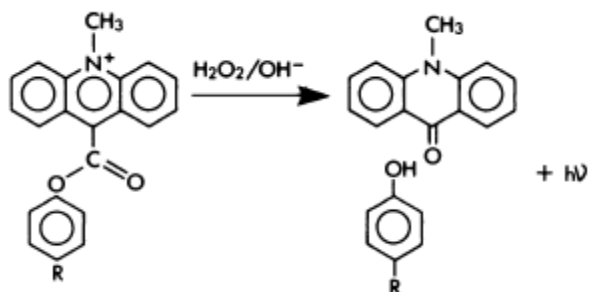
Za uspešno izveden test je potrebno predhodno ustrezno pripraviti serumski vzorec, in sicer z redukcijo z 1 mM TCEP-om (tris (2-karboksietil) fosfinom) (104). TCEP prekine disulfidne vezi proteinov (106). Redukcija omogoča spontano kompeticijo med serumskim RECAF-om in akridinskim konjugatom za vezavo na protitelesa. Po 2-urni inkubaciji pri 37 °C sledi spiranje ploščice z vodo z namenom odstranitve nevezanega akridinskega konjugata. Na koncu izvedemo detekcijo s kemiluminometrom, ki izmeri koncentracijo vezanega ACR-RECAF. Višja koncentracija akridinskega konjugata pomeni nižjo koncentracijo serumskega RECAF-a v vzorcu. Pravilno koncentracijo serumskega RECAF-a v testiranih vzorcih določimo s pomočjo umeritvene krivulje. Umeritveno krivuljo pridobimo iz standardnih RECAF raztopin (104).



Slika 8: Reakcijska shema v odsotnosti RECAF-a v vzorcu (107)



Slika 9: Reakcijska shema v prisotnosti RECAF-a v vzorcu (107)



Slika 10: Reakcija kemiluminiscence akridinijevega estra (108)

3.1.2 Materiali

- Encimski konjugat RECAF-akridin,
- protitelesa anti-RECAF, imobilizirana na mikrotitrski ploščici,
- set referenčnih standardov (100–22, 300 RECAF enot),
- TCEP,
- prazne mikrotitske ploščice (BD Falcon, serijska št.: 8267001),
- avtomatske pipete,
- nastavki za pipete,
- vortex,
- destilirana voda,
- pufer za redčenje (0,25 M malonatni pufer, pH = 4,0),
- kemiluminometer (Beckman Coulter) in
- inkubator.

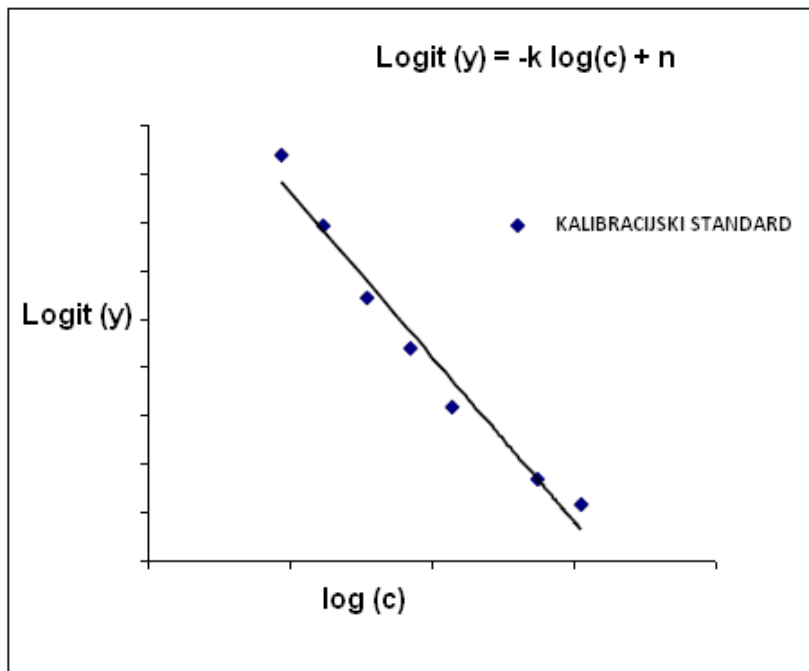
3.1.3 Postopek testa CIA

1. Vse reagente, vključno s serumskimi vzorci, pred uporabo prenesemo na sobno temperaturo (18–25 °C). Ponavadi temperiranje na sobno temperaturo traja približno 2 uri.
2. Sledi redukcija vzorcev in RECAF standardov s TCEP-om. Za redukcijo vsebine ene ploščice pripravimo založno raztopino 5 mM TCEP-a v destilirani vodi iz 100 mM osnovne raztopine TCEP-a. 5 mM TCEP-a pripravimo po postopku:
10 µl 100 mM TCEP-a + 190 µl destilirane vode.
3. Iz pripravljene 5 mM raztopine TCEP-a odpipetiramo 2 µl v vsako vdolbino mikrotitrskе ploščice (BD Falcon, serijska št.: 8267001) na mesta 3A–12H. Prenesemo tudi 2 µl TCEP-a v jamico A1 za redukcijo osnovnega RECAF standarda.
4. V vdolbine mikrotitrskе ploščice, ki vsebujejo 2 µl 5 mM TCEP-a, dodamo serumskе vzorce ter prenesemo osnovno standardno raztopino RECAF-a na pozicijo A1.
5. Raztopino vzorca in reducenta pustimo od 45 minut do 1 ure na sobni temperaturi, da poteče reakcija.

6. Po redukciji sledi redčenje vzorcev (15-krat) na isti ploščici, in sicer s 140 μ l pufru za redčenje (0,25 M malonatni pufer, pH = 4,0). Novo pripravljene raztopine dobro premešamo.
7. Na drugo prazno mikrotitrsko ploščico (BD Falcon, serijska št.: 8267001) prenesemo 10 μ l razredčenega vzorca. Na tej ploščici pripravimo končno redčino vzorcev (1/150), tako da dodamo še 90 μ l pufru za redčenje.
8. Na prvi ploščici pripravimo set RECAF standardov v območju od 22,300 do 100 RECAF enot z redčitvijo osnovnega TCEP-reduciranega RECAF standarda iz vdolbine A1.
9. Na novo ploščico z imobiliziranimi protitelesi prenesemo 50 μ l vsakega RECAF standarda v dveh paralelkah v kolono 1 in 2. V pripadajoče vdolbinice mikrotitrsko ploščice odpipetiramo 50 μ l vzorca, redčenega 1/150.
10. V vsako vdolbinico na ploščici naneseemo 50 μ l konjugata ACR-RECAF s koncentracijo 150 ng/ml.
11. Mešamo 30 sekund.
12. Inkubiramo 2 uri pri 37 °C.
13. Odstranimo vsebino ploščice.
14. Mikrotitrsko ploščico 3-krat speremo z destilirano vodo ter jo osušimo.
15. V roku 10 minut izvedemo detekcijo s kemiluminometrom pri 405 nm.

3.1.4 Izračun rezultatov

Kemiluminometer s pomočjo fotopomnoževalke izmeri jakost svetlobnega signala. Signal je odvisen od količine vezanega akridinskega konjugata (ACR-RECAF). Večja kot je ta količina, višji je signal. Signal se podaja v relativnih svetlobnih enotah ("RLU"). Glede na dobljeni odziv sorazmerno s pomočjo umeritvene krivulje določimo koncentracijo tumorskega markerja v enotah/ml (kU/ml, v našem primeru kRECAF enot/ml) v standardnih raztopinah in vzorcih. Območje merjenja sega od 100 do 22,300 RECAF enot/ml. Umeritvena krivulja sledi linearni funkciji z negativnim naklonom (Slika 11). Vzorcem z nižjim signalom pripada večji delež RECAF enot/ml.



Slika 11: Tipična oblika umeritvene krivulje

Linearno obliko kalibracijske krivulje pridobimo s pomočjo logit transformacije sigmoidne krivulje (krivulja odziva v odvisnosti od logaritma koncentracije) (111). Pred logit transformacijo moramo vrednosti dobljenega odziva za standarde podati v odstotkih maksimalnega odziva (% vezave) (110).

B.....vrednost odziva standarda oziroma vzorca v RLU

B₀.....vrednost maksimalnega odziva v RLU

$y = B / B_0$ % vezanega ACR-RECAF (vrednosti se gibljejo v intervalu od 0 do 1)

Ko narišemo umeritveno krivuljo odvisnosti odstotka vezave ali vrednosti RLU od logaritma koncentracije, dobimo sigmoidno krivuljo. Izračunamo logit od B/B_0 :

$$\text{logit}(B / B_0) = \ln\left(\frac{B / B_0}{1 - B / B_0}\right) \quad (112)$$

Z uporabo linearne regresije dobimo premico. Iz podatka o odzivu serumskih vzorcev (RLU) izračunamo % vezanega ACR-RECAF. Z interpolacijo teh vrednosti dobimo koncentracijo RECAF-a v vzorcu.

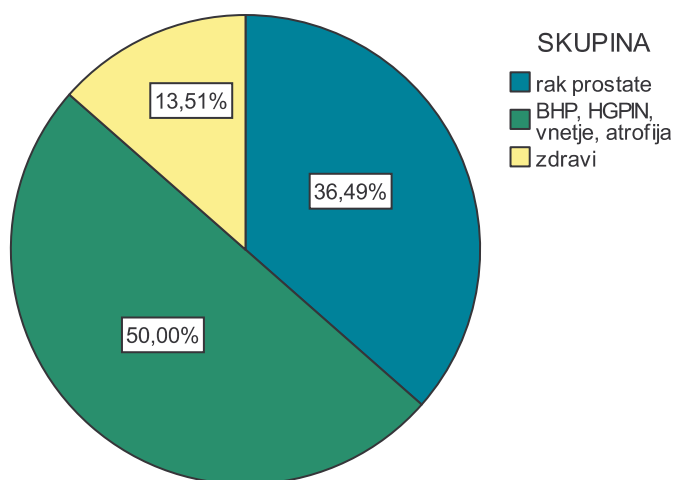
3.2 STATISTIČNE METODE

Obdelava podatkov je potekala s pomočjo standardnih statističnih programov, kot sta Microsoft Excel in SPSS. Podatke smo statistično ovrednotili s pomočjo grafov, izračunali smo vrednosti statističnih parametrov, kot so standardna deviacija, srednja vrednost, ... Testirali smo porazdelitev podatkov in na njeni osnovi nadaljevali s statistično obravnavo, iz katere smo na koncu povzeli zaključke.

4 REZULTATI

4.1 VZORCI IN TESTIRANJA

V skupini s potrjeno diagnozo raka prostate je bilo 27 bolnikov (skupina 1), ki so bili diagnosticirani s pomočjo histološke preiskave. V drugo skupino štejemo bolnike z drugimi spremembami tkiva, kot so BHP, atrofija, vnetje in HGPIN. Teh bolnikov je bilo 37 (skupina 2). Kontrolna skupina je obsegala 10 zdravih preiskovancev.



Graf 4: Število vzorcev v posameznih skupinah

Analizirali smo torej 64 vzorcev bolnikov, ki smo jim določili koncentracijo PSA, delež proste frakcije PSA ter koncentracijo RECAF-a. Poleg vseh teh testov smo pridobili tudi podatke o velikosti prostate (TRUZ) in kliničnem stadiju (DRP) ter histološki izvid, na podlagi katerega je bila podana diagnoza. Pri bolnikih z rakom smo pridobili tudi podatke

o Gleasonovi stopnji razvoja tumorja. Desetim preiskovancem kontrolne skupine smo določili le koncentracijo RECAF-a v serumu.

4.2 REZULTATI POSAMEZNIH SKUPIN

Preglednica 2: Pridobljeni rezultati za skupino 1: RAK PROSTATE

Zaporedna številka	Datum rojstva	Datum odvzema vzorca	Celotni PSA [ng/ml]	Prosta frakcija PSA [%]	RECAF [kRECAF enot/ml]	Klinični stadij (DRP)	Volumen prostate (TRUZ) (cm ³)
1	1. 1. 1943	6. 10. 2009	4,59	16	1,98	T2a	44
2	3. 1. 1941	16. 6. 2009	153	13	7,53	T3a	41,5
3	28. 11. 1946	16. 6. 2009	2,61	22	6,94	T2a	51
4	2. 2. 1923	17. 11. 2009	8,94	12	3,18	T2a	23
5	29. 4. 1934	19. 5. 2009	13,3	13	4,52	T2a	29,3
6	19. 7. 1942	17. 11. 2009	5,57	9	9,29	bp	21
7	28. 2. 1929	24. 9. 2009	11,9	6	3,39	T2a	36
8	6. 30. 1932	12. 1. 2009	18,6	11	9,82	T3a	17,8
9	6. 9. 1928	12. 1. 2009	5,22	15	5,95	bp	28,3
10	29. 4. 1931	2. 6. 2009	13,7	14	3,97	T2c	38,6
11	26. 8. 1932	6. 10. 2009	7,73	7	3,74	bp	17
12	28. 10. 1949	12. 1. 2009	3,01	23	10,14	bp	50,4
13	8. 1. 1939	12. 1. 2009	4,27	18	18,10	T2a	53,8
14	2. 3. 1932	6. 10. 2009	11,1	8	9,52	T2a	19
15	11. 9. 1949	17. 11. 2009	13,2	7	4,26	bp	30
16	14. 7. 1936	8. 3. 2010	7,71	10	2,38	T2a	32,5
17	21. 7. 1929	8. 3. 2010	8,28	19	3,04	T3	8,2
18	25. 1. 1950	29. 9. 2009	15,4	7	3,30	T3	35
19	20. 8. 1953	29. 9. 2009	2,71	19	3,99	bp	20
20	23. 12. 1934	26. 1. 2010	6,3	7	5,29	T2a	23,7
21	7. 9. 1933	26. 1. 2010	4,42	41	4,32	T3b	54
22	6. 9. 1933	25. 2. 2010	17,2	6	4,72	T3	23
23	25. 5. 1952	23. 2. 2010	1,97	28	4,91	bp	37
24	30. 10. 1948	23. 2. 2010	4,57	21	9,55	bp	27
25	12. 2. 1935	18. 1. 2010	3,21	9	6,54	T2a	28
26	21. 12. 1941	1. 4. 2010	6,47	11	12,75	T2b	23
27	13. 7. 1951	19. 5. 2009	169	ni bil določen	4,57	T4	32

Preglednica 3: Pridobljeni rezultati za skupino 2: BHP, vnetje, atrofija, HGPIN

Zaporedna številka	Datum rojstva	Datum odvzema vzorca	Celotni PSA [ng/ml]	Prosta frakcija PSA [%]	RECAF [kRECAF enot/ml]	Klinični stadij (DRP)	Volumen prostate (TRUZ) [cm ³]
1	4. 9. 1940	9. 4. 2009	4,25	9	7,36	bp	64,3
2	29. 7. 1937	12. 1. 2009	2,77	13	4,33	T2c	31,1
3	18. 9. 1940	9. 4. 2009	2,8	24	3,45	bp	60,6
4	10. 1. 1942	22. 9. 2009	4,39	10	3,81	bp	37
5	7. 5. 1950	3. 12. 2009	2,47	21	4,79	bp	56,8
6	24. 6. 1936	6. 10. 2009	9,91	23	6,31	T2a	86
7	20. 2. 1951	17. 11. 2009	2,23	6	2,53	T2a	22
8	5. 1. 1954	9. 3. 2010	5,1	6	4,29	bp	57,3
9	5. 10. 1952	9. 4. 2009	5,69	18	7,52	T2a	40,3
10	21. 7. 1952	26. 11. 2009	1,02	33	11,76	bp	28
11	17. 11. 1951	8. 12. 2009	3,45	7	5,34	bp	45
12	20. 8. 1943	22. 9. 2009	2,44	24	3,98	bp	86
13	2. 12. 1947	23. 2. 2010	6,01	13	6,88	bp	ni bil določen
14	6. 11. 1948	28. 5. 2009	5,29	15	7,89	bp	56
15	26. 3. 1951	19. 5. 2009	7,47	6	1,45	bp	48,1
16	25. 3. 1947	24. 9. 2009	4,32	10	3,87	bp	46
17	15. 9. 1948	24. 9. 2009	3,42	11	8,93	bp	43
18	29. 12. 1949	9. 4. 2009	2,02	25	4,81	T2b	38,2
19	28. 2. 1941	24. 9. 2009	0,52	58	12,34	T2a	36
20	5. 2. 1938	8. 3. 2010	7,94	9	4,55	bp	21
21	23. 10. 1952	17. 11. 2009	5,02	14	13,97	bp	48
22	28. 6. 1940	2. 6. 2009	0,92	13	2,48	bp	48,9
23	18. 1. 1931	8. 3. 2010	3,34	21	3,64	T2a	80,4
24	2. 1. 1930	11. 2. 2010	5,86	27	4,04	bp	47,5
25	10. 1. 1936	5. 1. 2010	4,25	25	3,09	bp	43
26	10. 1. 1931	5. 1. 2010	8,85	24	4,33	T2a	119
27	29. 11. 1942	29. 9. 2009	3,15	13	5,30	bp	51
28	19. 9. 1948	26. 1. 2010	2,67	6	9,70	T2a	38,5
29	6. 12. 1939	26. 1. 2010	2,4	14	2,53	T2b	41
30	29. 8. 1946	23. 3. 2010	4,84	13	10,20	bp	63,8
31	28. 4. 1940	16. 11. 2009	2,23	22	9,58	T2a	23,6
32	7. 9. 1946	26. 11. 2009	3,57	15	13,54	T2	35
33	27. 5. 1942	19. 1. 2010	4,81	22	9,79	bp	48
34	14. 9. 1946	19. 1. 2010	2,2	44	5,66	bp	38
35	17. 12. 1946	21. 1. 2010	1,29	42	7,64	bp	45
36	4. 9. 1937	21. 1. 2010	4,8	2	12,20	T2	53
37	1. 9. 1951	25. 1. 2010	5,34	3	9,79	bp	20

Preglednica 4: Pridobljeni rezultati za kontrolno skupino

Zaporedna številka	RECAF [kRECAF enot/ml]
1	2,19
2	1,10
3	2,29
4	3,94
5	3,81
6	3,01
7	3,14
8	2,50
9	3,34
10	2,67

4.3 POTEK OBDELAVE PODATKOV

V prvem delu smo med obema obstoječima skupinama bolnikov primerjali koncentracijo novega tumorskega markerja RECAF-a. Primerjali smo povprečne vrednosti in standardne odklone. Ugotovili smo porazdelitev podatkov v obeh skupinah in na osnovi tega testirali ničelno hipotezo o enakosti povprečij obeh skupin.

V drugem delu smo s pomočjo kliničnih podatkov izračunali specifičnost in občutljivost novega tumorskega markerja. Rezultate smo primerjali s PSA in njegovo prosto frakcijo, izračunali smo korelacijo med njimi ter na podlagi rezultatov podali uporabnost novega tumorskega markerja v klinični praksi.

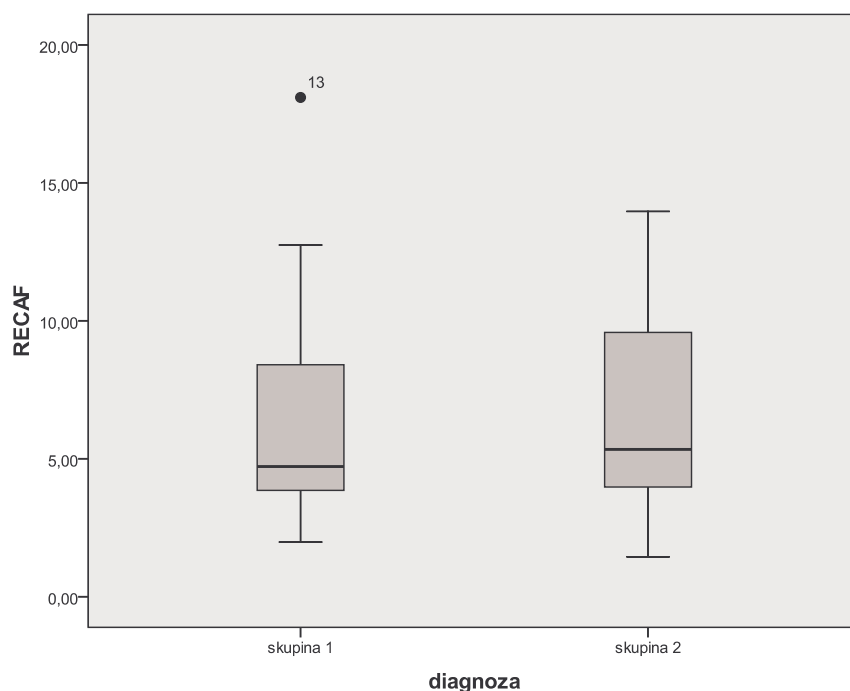
4.4 PRIMERJAVA REZULTATOV MED SKUPINAMA BOLNIKOV

4.4.1 Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov

Pred določitvijo vrednosti deskriptivnih statistik smo preverili prisotnost osamelcev, ki bi lahko motili nadaljnjo statistično obdelavo (109). Iz grafa 5 lahko razberemo, da je v populaciji rakavih bolnikov prisotna osamela vrednost, ki odstopa od ostalih. Vrednost osamelca v nadaljnji statistični obravnavi nismo upoštevali.

Kvartilni diagram spodaj prikazuje primerjavo rezultatov skupine 1 in skupine 2. Iz grafične predstavitve obeh vzorcev se vidi, v kakšnem razponu se porazdeljujejo podatki posamezne skupine, torej njihove maksimalne in minimalne vrednosti ter vrednosti

spodnjega in zgornjega kvartila (Q1, Q3). Spodnji kvartil (Q2) je vrednost od katere je ena četrtna vrednosti slučajne spremenljivke manjših in štiri četrtine vrednosti večjih od vrednosti kvartila. Za Q3 velja ravno obratno. Q2 je mediana, ki razdeli vzorec na dva enaka dela. Sivo območje predstavlja interkvartilno področje oziroma kvartilni razmik, s katerim pridobimo podatek o razpršenosti podatkov (113).



Graf 5: Kvartilni diagram – porazdelitev rezultatov za RECAF v obeh skupinah bolnikov

Povprečna vrednost za skupino 1 znaša 5,78 kRECAF enot, za skupino 2 pa 6,59 kRECAF enot. Povprečna vrednost in standardna odklona sta med obema skupinama bolnikov zelo primerljiva (Preglednica 5).

Preglednica 5: Vrednosti statističnih parametrov obeh skupin bolnikov

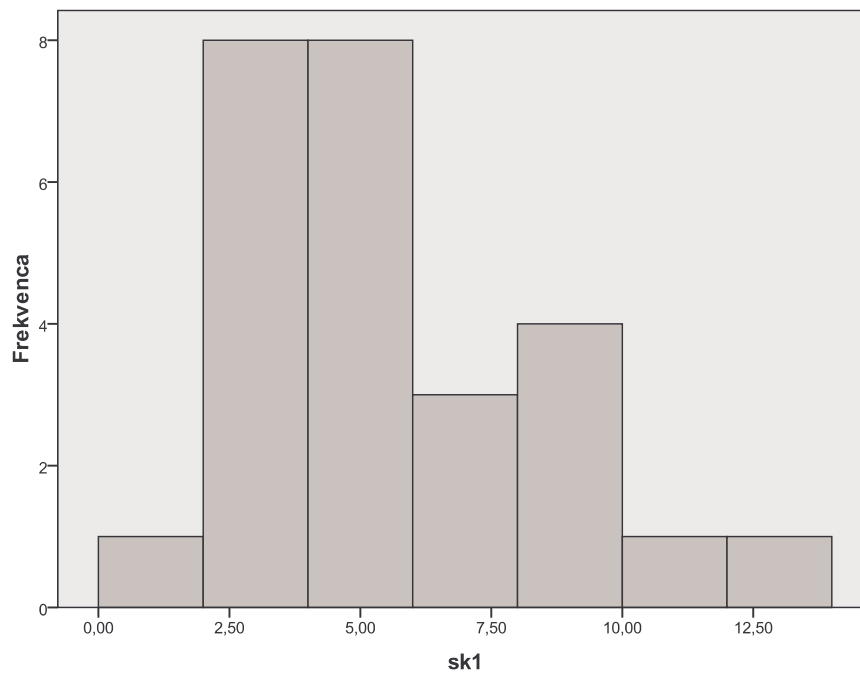
	Skupina 1	Skupina 2
Aritmetična sredina	5,75	6,59
Mediana	4,65	5,34
Maksimum	12,75	13,97
Minimum	1,98	1,45
Standardna deviacija	2,84	3,42
Število vzorcev	26	37

4.4.2 Test normalne porazdelitve podatkov v obeh skupinah

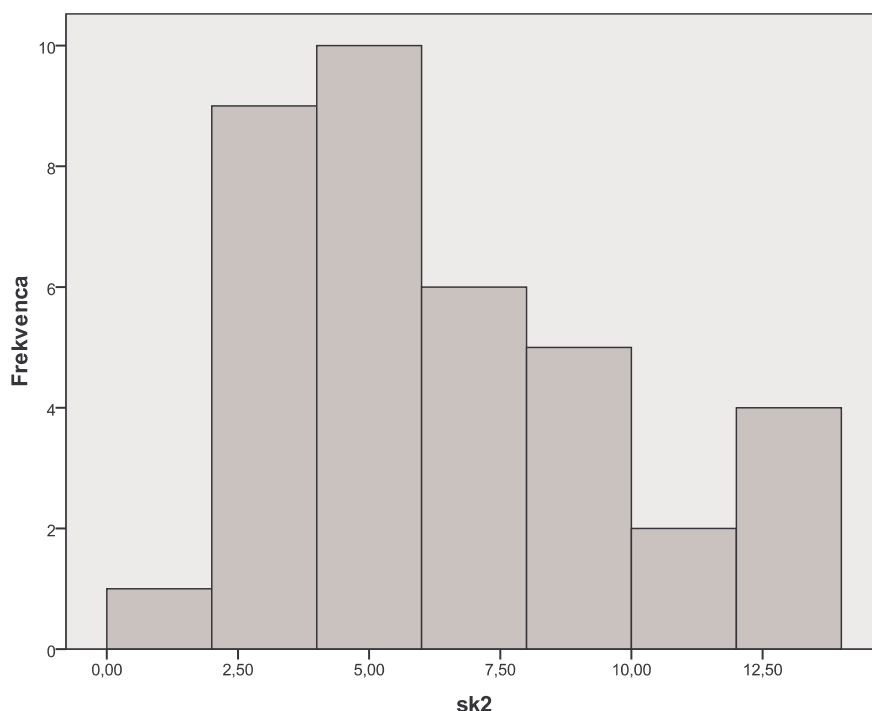
Za preverjanje normalnosti smo uporabili Shapiro-Wilkov test. Test primerja vrednosti preučevane spremenljivke z vrednostmi normalno porazdeljene spremenljivke z enako aritmetično sredino in standardno deviacijo, kot ju ima preučevana spremenljivka. Pri testiranju smo upoštevali stopnjo tveganja $\alpha = 0.05$. Vrednost p je bila v obeh skupinah manjša od α (Preglednica 6). Ničelno hipotezo o normalnosti smo zavrnil in sprejeli alternativno hipotezo, ki pravi, da vrednosti obeh vzorcev niso normalno porazdeljene (Graf 6, Graf 7).

Preglednica 6: Testiranje normalne porazdelitve rezultatov obeh skupin bolnikov

	Shapiro-Wilkov test		
	Stat.	df.	p
Skupina 1	0,901	26	0,016
Skupina 2	0,853	26	0,002



Graf 6: Nenormalna porazdelitev rezultatov v skupini 1



Graf 7: Nenormalna porazdelitev rezultatov v skupini 2

4.4.3 Ugotavljanje razlik v koncentraciji RECAF-a med obema skupinama bolnikov

Poskušali smo ugotoviti, ali je med obema skupinama bolnikov koncentracija RECAF-a statistično značilno različna. Ker rezultati v obeh skupinah bolnikov niso normalno porazdeljeni, smo uporabili Mann-Whitneyjev test, ki je neparametričen analog testu T (3).

Vrednosti številčne spremenljivke obeh vzorcev smo pretvorili v range, torej smo vrednosti obeh vzorcev uredili po velikosti. Najmanjši vrednosti smo pripisali rang 1, naslednji najmanjši rang 2 in tako naprej. Dobili smo ranžirno vrsto, na osnovi katere smo izračunali vrednosti testne statistike. Na podlagi seštevka smo dobili vsoto rangov za posamezen vzorec (R_x , R_y). Povprečni rang za posamezen vzorec izračunamo tako, da vsoto rangov delimo z velikostjo vzorca (N). Pri Mann-Whitneyjevem testu vsak rezultat iz prvega vzorca primerjamo z vsakim rezultatov iz drugega vzorca. Če vzorca prihajata iz iste populacije, kot pravi ničelna hipoteza, ima vsaka vrednost iz prvega vzorca enako možnost, da je večja ali manjša od vsake vrednosti drugega vzorca.

$$H_0 = p(x_i > y_j) = \frac{1}{2} \quad (114)$$

$$H_1 = p(x_i > y_j) \neq \frac{1}{2} \quad (114)$$

Pri katerem je x_i vrednost iz prvega vzorca in y_j iz drugega vzorca. Ničelno hipotezo zavržemo, ko so vrednosti enega vzorca statistično značilno večje od drugega vzorca.

Pri Mann-Whitneyjevem testu štejemo število primerov, ko je x iz vzorca A večji od y iz vzorca B, in obratno. Dobimo vrednost testne statistike (U):

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1 \quad (115)$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2 \quad (115)$$

Nato pogledamo, katera izmed obeh vrednostih U je manjša (U_{\min}). Za majhne vzorce kritično vrednost (U_{krit}) dobimo iz tabele za Mann-Whitneyjev test. Pri večjih vzorcih se testna statistika U približno normalno porazdeljuje s povprečno vrednostjo μ_U in standardno deviacijo σ_U .

$$\mu_U = \frac{n_x n_y}{2} \quad \text{in} \quad \sigma_U = \sqrt{\frac{n_x n_y (N + 1)}{12}}, \quad N = n_x + n_y \quad (114, 115)$$

Če uporabimo normalno aproksimacijo ($n > 8$), testna statistika postane absolutna z-vrednost:

$$z = \frac{U - \mu_U}{\sigma_U} \quad (115)$$

ki jo primerjamo s kritično z-vrednostjo, ter potrdimo statistično značilno razliko, če je:

$$|z_{\text{exp}}| \geq |z_c| \quad (115)$$

V preglednici 7 so podane vsote rangov ter povprečne vrednosti rangov za obe skupini. Če primerjamo povprečno vrednost rangov obeh vzorcev ugotovimo, da je povprečje za prvo skupino manjše. Zanima nas, ali je ta razlika v povprečni vrednosti rangov s 5% stopnjo tveganja značilna. To nam odgovori preglednica 8. Potrdimo ničelno hipotezo, da oba vzorca prihajata iz iste populacije ($p > 0,05$).

Preglednica 7: Povprečni rang in vsota rangov

	N	Povprečni rang	Vsota rangov
Skupina 1	26	29,38	764,00
Skupina 2	37	33,84	1252,00

Preglednica 8: Testne statistike (Mann-Whitneyjev test)

	RECAF
Mann-Whitney U	413,00
Z	-0,949
p	0,324

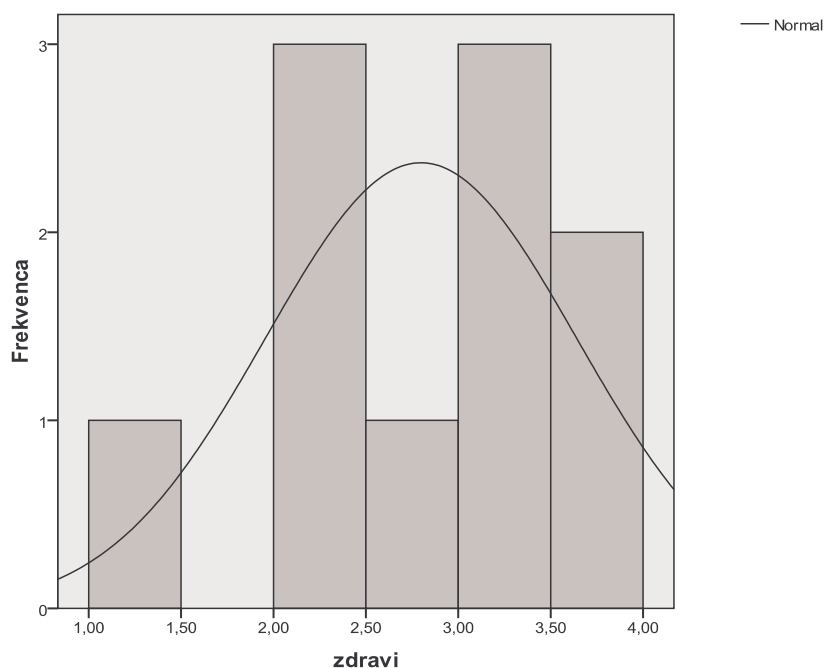
4.5 DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST

4.5.1 Določitev mejne vrednosti RECAF-a (*“cut-off value”*)

Za izračun diagnostične občutljivosti in specifičnosti smo najprej potrebovali podatek o referenčnih vrednostih parametra. Mejne vrednosti smo določili z uporabo podatkov, pridobljenih iz testiranja zdravih preiskovancev (kontrolna skupina). Porazdelitev podatkov v kontrolni skupini se bistveno ne razlikuje od normalne porazdelitve ($p > 0.05$) (Preglednica 9). Na osnovi normalne distribucije podatkov smo izračunali meje referenčnih vrednosti.

Preglednica 9: Test normalne porazdelitve v kontrolni skupini

	Shapiro-Wilkov test		
	Stat.	df.	p
Zdravi	0,960	10	0,790



Graf 8: Normalna porazdelitev rezultatov v kontrolni skupini

Formuli za izračun spodnje in zgornje meje referenčnega intervala (116):

$$\text{Spodnja meja [RECAF enot/ml]} = m - t(0,975, n-1) \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times SD = \underline{0,80}$$

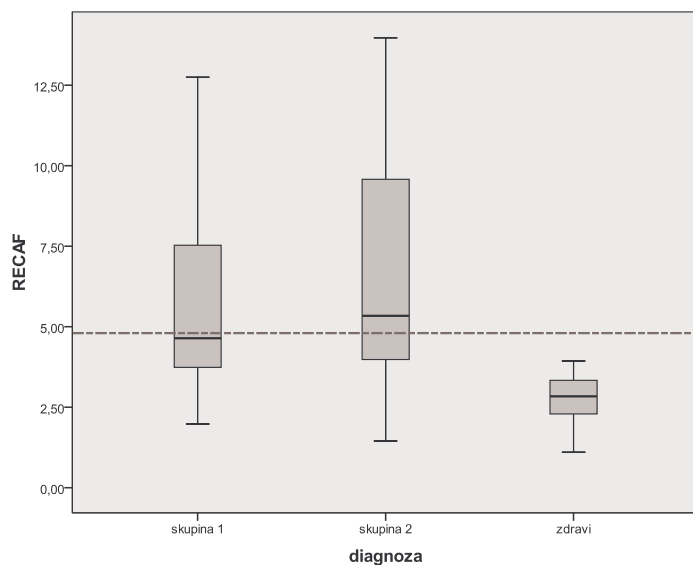
$$\text{Zgornja meja [RECAF enot/ml]} = m + t(0,975, n-1) \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times SD = \underline{4,80}$$

Pri čemer je m povprečna vrednost, $t(0,975, n-1)$ kritična t -vrednost pri enostranskem tveganju s prostostno stopnjo $n-1$, n je število vzorca in SD je standardna deviacija.

Preglednica 10: Podatki za izračun spodnje in zgornje referenčne meje

Povprečje (m)	SD	$t(0,975, 9)$	n
2,80	0,84	2,262	10

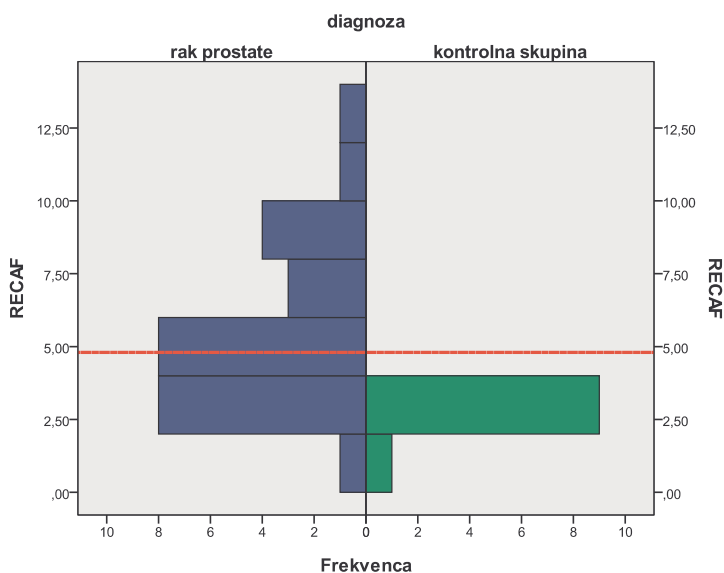
Referenčni interval sega od 0,80 do 4,80 kRECAF enot. Torej je 4,80 kRECAF enot mejna vrednost, ki odloča, ali je test pozitiven ali negativen.



Graf 9: Kvartilni diagram – primerjava porazdelitve rezultatov kontrolne skupine, skupine 1 (rak prostate) in skupine 2 (nemaligne bolezni). Izračunana mejna vrednost (4,80 kRECAF enot) je označena s sivo črtkano črto.

4.5.2 Specifičnost in občutljivost glede na zdrave preiskovance

Statistična parametra, kot sta diagnostična občutljivost in specifičnost novega tumorskega markerja, smo izračunali glede na kontrolno skupino zdravih preiskovancev.



Graf 10: Frekvenčni diagram porazdelitve podatkov med kontrolno in skupino rakavih bolnikov

Preglednica 11: Vrednosti parametrov deskriptivnih statistik kontrolne skupine in skupine rakavih bolnikov

	Zdravi	Bolniki z rakom prostate
Število vzorcev	10	26
Maksimum	3,94	12,75
Minimum	1,10	1,98
Standardna deviacija	0,84	2,84
Aritmetična sredina	2,80	5,75

Najprej smo primerjali vrednosti deskriptivnih statistik med obema vzorcema. Povprečna vrednost kontrolne skupine je manjša od povprečne vrednosti bolnikov z rakom (Preglednica 11). Zanimalo nas je, ali je ta razlika statistično značilna. Na osnovi nenormalne porazdelitve podatkov v skupini rakavih bolnikov smo izvedli Mann-Whitneyjev test. Rezultati so pokazali, da je koncentracija RECAF enot v skupini rakavih bolnikov statistično značilno večja v primerjavi s kontrolno skupino ($p < 0,05$) (Preglednica 12).

Preglednica 12: Mann-Whitneyjev test

	RECAF
Mann-Whitney U	30,000
Z	-3,532
p	0,000

Na osnovi mejne vrednosti 4,80 kRECAF enot smo rezultate razvrstili na resnično pozitivne, resnično negativne, lažno pozitivne in lažno negativne (Preglednica 13).

Preglednica 13: Število pozitivnih in negativnih testov glede na diagnozo (PP – pravilno pozitivni test pri bolniku z rakom, PN – pravilno negativni test pri zdravem preiskovancu, LP – lažno pozitivni test pri zdravem preiskovancu, LN – lažno negativni test pri bolniku z rakom)

	TEST	
	pozitivni	negativni
rak prostate	PP = 14	LN = 13
zdravi	LP = 0	PN = 10

Diagnostično specifičnost in občutljivost smo izračunali po enačbah:

$$\text{Diagnostična občutljivost [\%]} = \frac{PP \times 100}{PP + LN} = \underline{52 \%}$$

$$\text{Diagnostična specifičnost [\%]} = \frac{PN \times 100}{PN + LP} = \underline{100 \%}$$

Opazimo, da je diagnostična specifičnost pri mejni vrednosti 4,80 kRECAF enot 100%, občutljivost pa ravno presega 50 %. Z nižanjem mejne vrednosti bi lahko pridobili na občutljivosti, a posledično zmanjšali specifičnost. Da bi izvedeli, kolikšni sta specifičnost in občutljivost pri različnih mejnih vrednostih, smo izvedli analizo ROC.

Vrednosti obeh skupin skupaj smo razdelili na več mejnih vrednosti. Pri vsaki mejni vrednosti smo izračunali diagnostično specifičnost in občutljivost (Preglednica 14). Na podlagi teh podatkov smo narisali krivuljo ROC (Graf 11).

Preglednica 14: Občutljivost in specifičnost pri različnih mejnih vrednostih

Mejna vrednost	Občutljivost	1 - Specifičnost
0,1030	1,000	1,000
1,5415	1,000	,900
2,0865	,962	,900
2,2430	,962	,800
2,3365	,962	,700
2,4390	,923	,700
2,5830	,923	,600
2,8370	,923	,500
3,0230	,923	,400
3,0875	,885	,400
3,1575	,885	,300
3,2400	,846	,300
3,3180	,808	,300
3,3630	,808	,200
3,5650	,769	,200
3,7765	,731	,200
3,8755	,731	,100
3,9540	,731	,000
3,9800	,692	,000
4,1250	,654	,000

4,2900	,615	,000
4,4200	,577	,000
4,5450	,538	,000
4,6450	,500	,000
4,8150	,462	,000
5,1000	,423	,000
5,6200	,385	,000
6,2450	,346	,000
6,7400	,308	,000
7,2350	,269	,000
8,4100	,231	,000
9,4050	,192	,000
9,5350	,154	,000
9,6850	,115	,000
9,9800	,077	,000
11,4450	,038	,000
13,7500	,000	,000

Površina pod ROC krivuljo je verjetnost, da bo klasifikator (RECAF) pravilno ločil pozitivne od negativnih primerov, v našem primeru, bolnike in zdrave. Torej predstavlja verjetnost, da bo klasifikator pripisal višji rang naključno izbranemu bolniku z rakom kot naključno izbrani zdravi osebi. Iz tega sledi, da AUC pod ROC krivuljo povezujemo z natančnostjo klasifikatorja. Vrednosti za AUC se gibljejo med 0 in 1. ROC analiza je zelo povezana z Mann-Whitneyjevim U testom, saj pri obeh testih podatke rangiramo. Zvezo zapišemo z enačbo (117):

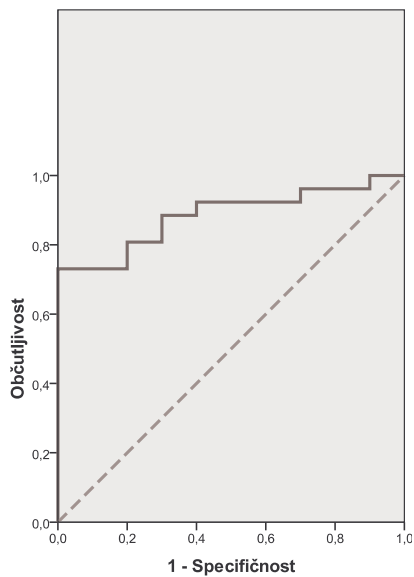
$$AUC_1 = \frac{U_1}{n_1 n_2}$$

Na podlagi visoke verjetnosti (0,885) lahko zaključimo, da večje koncentracije RECAF-a glede na zdrave preiskovance predstavljajo večjo verjetnost za prisotnost raka. Koncentracija RECAF-a v skupini rakavih bolnikov se statistično značilno razlikuje ($p < 0,05$) od koncentracije RECAF-a kontrolne skupine (Preglednica 15).

Preglednica 15: Analiza ROC za RECAF (rak prostate/zdravi)

		95% interval zaupanja	
Površina pod krivuljo	p	Spodnja meja	Zgornja meja
0,885	0,009	0,777	0,992

Določili smo tudi mejno vrednost, pri kateri je izraženo najboljše razmerje med specifičnostjo in občutljivostjo (Preglednica 14). To je vrednost 3,36 kRECAF enot, pri kateri sta specifičnost in občutljivost okoli 80%.

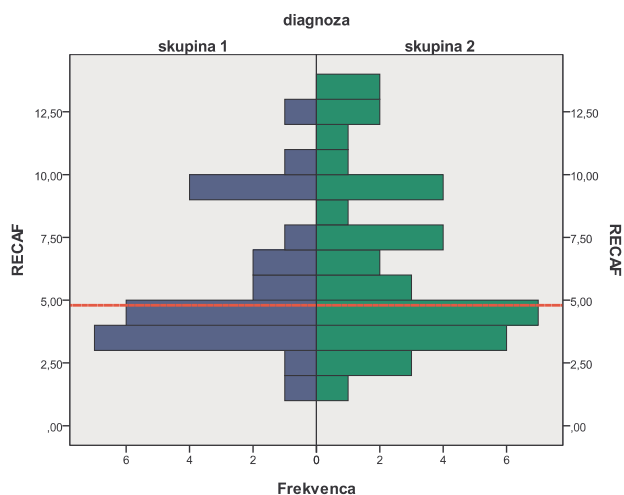


Graf 11: Krivulja ROC za RECAF (rak prostate/zdravi)

4.5.3 Specifičnost in občutljivost glede na bolnike z nemalignimi boleznimi prostate

Receptor za alfa-fetoprotein (RECAF)

Rezultati bolnikov z rakom so že na prvi pogled zelo primerljivi z rezultati bolnikov z hiperplazijo prostate in drugimi boleznimi prostate, ki niso maligne narave (Graf 13).



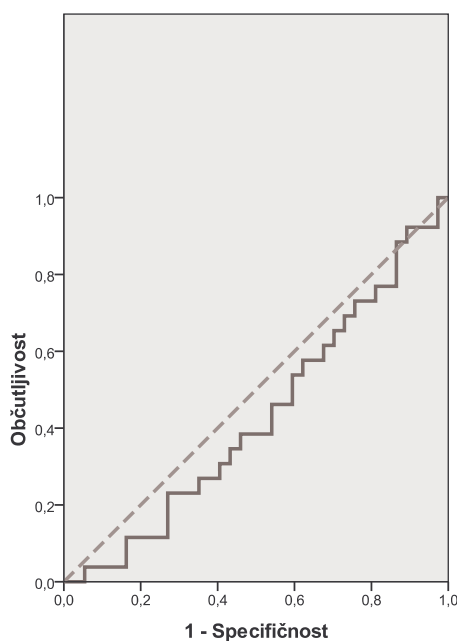
Graf 12: Frekvenčni diagram porazdelitve podatkov skupine 1 (rak prostate) in skupine 2 (nemaligne bolezni). Mejna vrednost (4,80 kRECAF enot/ml) je označena z rdečo črto.

Kakšna je uporabnost merjenja RECAF z metodo CIA, preverimo z analizo ROC. Iz krivulje ROC in površine pod krivuljo (0,429) sklepamo, da test ne loči med maligno in benigno boleznijo prostate (Preglednica 16, Graf 13).

Preglednica 16: Analiza ROC za RECAF (rak/nemaligne bolezni prostate)

		95% interval zaupanja	
Površina pod krivuljo	p	Spodnja meja	Zgornja meja
0,429	0,342	0,284	0,572

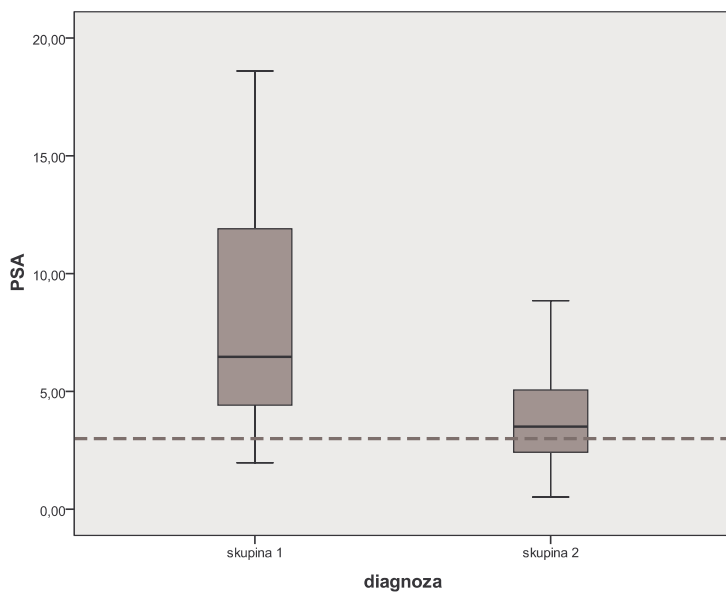
Pri mejni vrednosti 4,80 kRECAF enot je občutljivost 46% in specifičnost 43%.



Graf 13: Krivulja ROC za RECAF (rak/nemaligne bolezni)

Celokupna koncentracija PSA

Specifičnost in občutljivost smo izračunali tudi za klasični tumorski marker raka prostate, torej PSA. Najprej smo preverili prisotnost osamelcev in jih izločili (Graf 14).

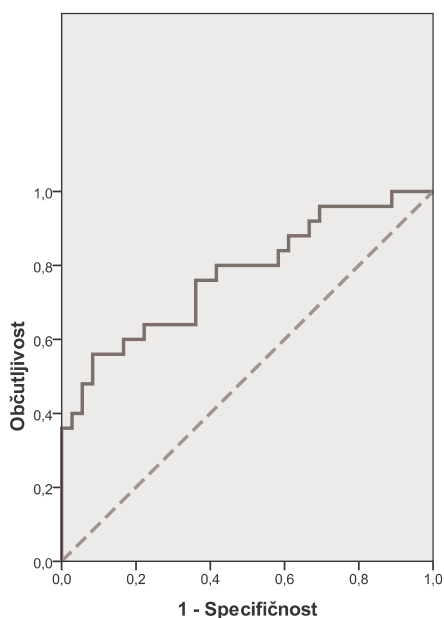


Graf 14: Kvartilni diagram – primerjava porazdelitve PSA v obeh skupinah bolnikov z izločenimi osamelci

Na podlagi analize ROC smo ugotovili, da je klinična uporabnost PSA glede na pridobljene rezultate bistveno večja (Preglednica 17 in Graf 15). Pri mejni vrednosti 3 ng/ml smo izračunali 88% občutljivost in 38% specifičnost.

Preglednica 17: Analiza ROC za PSA (rak/nemaligne bolezni prostate)

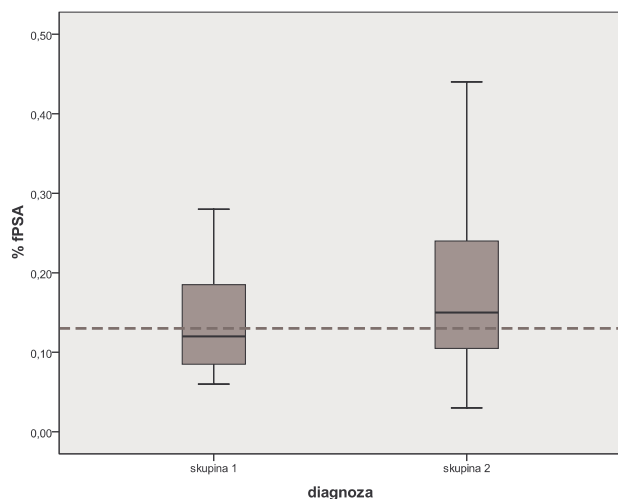
		95% interval zaupanja	
Površina pod krivuljo	p	Spodnja meja	Zgornja meja
0,774	0,000	0,652	0,897



Graf 15: Krivulja ROC za PSA (rak/nemaligne bolezni prostate)

Prosta frakcija PSA

Tudi za prosto frakcijo PSA smo določili diagnostično specifičnost in občutljivost. Ko smo na podlagi kvartilnega diagrama eliminirali osamele vrednosti, smo nadaljevali z analizo ROC (Preglednica 18).

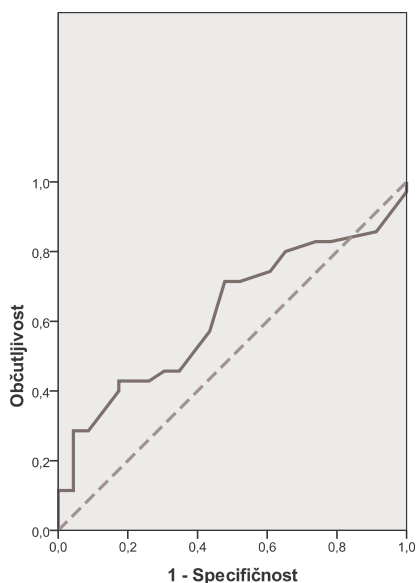


Graf 16: Kvartilni diagram – porazdelitev rezultatov za fPSA v obeh skupinah bolnikov brez osamelcev. Mejna vrednost (13 % fPSA) je označena s črtkano črto.

Rezultati za prosto frakcijo PSA kažejo na malenkost nižji delež fPSA pri bolnikih z rakom (Graf 16). Pri mejni vrednosti 13 % fPSA izkazuje prosta frakcija 71% občutljivost in 52% specifičnost (Graf 17).

Preglednica 18: Analiza ROC za delež fPSA (rak/nemaligne bolezni prostate)

		95% interval zaupanja	
Površina pod krivuljo	p	Spodnja meja	Zgornja meja
0,620	0,123	0,476	0,765



Graf 17: Krivulja ROC za delež fPSA (rak/nemaligne bolezni prostate)

4.5.4 Moč povezave med spremenljivkami (korelacija)

Mero povezanosti smo testirali med koncentracijo RECAF-a, celokupno koncentracijo PSA in njegovo prosto frakcijo. Ker imamo podatke porazdeljene nenormalno, smo moč povezave ovrednotili z neparametričnim Spearmanovim koeficientom korelacije (3).

Vrednosti RECAF enot ne korelirajo z vrednostmi celokupne PSA in ne s prosto frakcijo PSA (Preglednica 19).

Preglednica 19: Korelacija med PSA, deležem fPSA in RECAF-om

		RECAF	PSA	fPSA
RECAF	korelacijski koeficient	1	-0,135	0,163
	p	-	0,305	0,227
	N	63	60	57
PSA	korelacijski koeficient	-0,135	1	0,490
	p	0,305	-	0,000
	N	60	61	58
delež fPSA	korelacijski koeficient	0,163	0,490	1,000
	p	0,227	0,000	-
	N	57	58	58

Korelacijska analiza kvantificira moč linearne povezave med dvema spremenljivkama x in y . Moč povezave smo ovrednotili s Spearmanovim koeficientom korelacije (r_s), saj naši podatki ne sledijo normalni distribuciji. Območje vrednosti koeficienta sega od -1 do +1. Višje absolutne vrednosti pomenijo višjo stopnjo linearne povezave. -1 pomeni negativno korelacijo, torej se vrednosti ene spremenljivke zmanjšujejo z večanjem vrednosti druge spremenljivke. Pri pozitivni korelaciji (+1) pa obe spremenljivki istočasno naraščata. Absolutnim vrednostim koeficienta nad 0.7 pripisujemo močno korelacijo. S pomočjo programa pridobimo tudi podatke o p-vrednostih (verjetnost dobljenega rezultata ob predpostavki H_0 -ničelna hipoteza). V primeru, da je $p < 0.05$, zavrnilo ničelno hipotezo, ki pravi, da je korelacija nesignifikantna ($r = 0$). V našem primeru potrdimo signifikantno korelacijo le med PSA in prosto frakcijo, kar je pričakovano.

5 RAZPRAVA

Serumskim vzorcem rakavih bolnikov in tudi bolnikom z nemaligimi boleznimi prostate smo izmerili koncentracijo potencialnega tumorskega markerja, receptorja za alfa-fetoprotein. Testiranja so bila izvedena z metodo kemiluminiscence ("CIA"). V prvem delu smo primerjali rezultate med dvema skupinama bolnikov. Prva skupina je sestavljala bolnike z rakom prostate. V drugo skupino smo uvrstili bolnike z drugimi spremembami tkiva, torej z benigno hiperplazijo, atrofijo, vnetjem, predmaligno stopnjo karcinoma ali kombinacijo le-teh. Ob pregledu vrednosti deskriptivnih statistik smo opazili, da so rezultati med obema skupinama zelo primerljivi.

Veliko študij je bilo izvedenih na podlagi radioimunskega testa z radioaktivno označenim receptorjem za AFP. V teh študijah so bili benigni tumorji večinoma RECAF negativni. Visoki rezultati pri teh bolnikih v naši študiji so lahko posledica motečih dejavnikov, kar bi bilo lahko vnetje, bolezni jeter in ledvic ter hemolitični in hiperlipemični vzorci. V skupini bolnikov z benignimi boleznimi so podatki tudi bistveno bolj razpršeni ($SD = 3,42$) kot v skupini rakavih bolnikov ($SD = 2,84$). Razlog je lahko tudi v nenatančnosti in netočnosti metode, saj podatkov o točnosti in natančnosti nismo uspeli pridobiti.

S pomočjo Shapiro-Wilkovega testa smo določili porazdelitev rezultatov v obeh skupinah bolnikov. Rezultati se ne porazdeljujejo po normalni distribuciji. Ker imamo dva neodvisna vzorca, smo z neparametričnim Mann-Whitneyjevim testom potrdili, da je koncentracija RECAF-a v obeh skupinah enaka. Na osnovi tega lahko rečemo, da test CIA ne loči med maligno in benigno spremembo prostate. Test CIA-RECAF je bil razvit za ločitev med serumom bolnika z rakom in zdravega posameznika. Mogoče bi bilo potrebno v okviru razvoja metode upoštevati tudi možne povzročitelje lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Ti odkloni so velikokrat posledica raznih fizioloških stanj. Do sedaj ni znano, zakaj so nekateri benigni vzorci pozitivni. V tem primeru gre lahko za premaligne vzorce in se ekspresija markerja poveča še pred morfološko spremembo, katere proces je zelo počasen. Patolog v tem primeru ne potrdi morfološke spremembe tkiva, poslanega na histološko preiskavo. Vsekakor so potrebne še dodatne raziskave biologije molekule RECAF-a, ki bi razložile, zakaj so nekateri benigni vzorci pozitivni, in s tem omogočile lažjo interpretacijo rezultatov testiranja.

V drugem delu smo izračunali učinkovitost metode za določanje serumske vrednosti RECAF enot. V prvem koraku smo diagnostično specifičnost in občutljivost določili glede na kontrolno skupino zdravih preiskovancev. Najprej smo na podlagi rezultatov kontrolne skupine izračunali meje referenčnega intervala. Interval je segal od 0,84 do 4,80 kRECAF enot/ml. Mejno vrednost smo torej postavili pri 4,80 kRECAF enot. Na podlagi tega smo opredelili lažno pozitivne in lažno negativne rezultate. Specifičnost je bila 100% in občutljivost 52%. Glede na podobno študijo na vzorcih pacientk z rakom na jajčnikih so te vrednosti zelo primerljive (11). V študiji so uporabili metodo CIA ter ob upoštevanju mejne vrednosti 7,5 kRECAF enot pri 100% specifičnosti izračunali 52,5% občutljivost. Diagnostično vrednost smo opredelili z analizo ROC. Površina pod krivuljo (AUC) je znašala 0,885. Iz tega lahko zaključimo, da serumski test CIA dobro loči 10 zdravih preiskovancev od 25 bolnikov z rakom prostate.

Glede na to, da je povprečna vrednost pri bolnikih z nemalignimi boleznimi višja kot pri rakavih bolnikih, sta tudi diagnostična specifičnost in občutljivost temu primerni. Površina pod krivuljo je posledično padla pod 50 %. V okviru kliničnih podatkov smo pridobili tudi vrednosti za PSA in delež fPSA za obe skupini bolnikov. Za PSA smo pri mejni vrednosti 3 ng/ml izračunali 88% občutljivost in 38% specifičnost. Glede na naše rezultate lahko potrdimo, da merjenje PSA pripomore k diagnostiki raka prostate, saj se vrednost parametra med obema skupinama bolnikov statistično značilno razlikuje ($p < 0,05$). Na koncu smo preverili še primernost proste oblike PSA za diagnostiko raka prostate. Rezultati so potrdili malenkost večji delež proste frakcije pri bolnikih z nemalignimi boleznimi prostate. Pri mejni vrednosti 13 % fPSA smo določili 71% občutljivost in 52% specifičnost. Površina pod krivuljo ROC je bila majhna (0,620). Obstaja torej majhna verjetnost, da bo rezultat za naključno pozitivni vzorec presegel rezultat za naključno negativni vzorec. Uporaba proste frakcije PSA po naših rezultatih ne pripomore k diagnostiki raka prostate, saj med skupinama bolnikov ni značilne statistične razlike v koncentraciji prostega PSA ($p > 0,05$).

Na koncu smo izračunali korelacijo med RECAF-om in PSA ter RECAF-om in deležem fPSA. Korelacije v nobenem primeru nismo potrdili.

6 SKLEP

V okviru diplomske naloge z naslovom *“Pomen določanja koncentracije receptorja za alfa- fetoprotein (RECAF) pri bolnikih z rakom prostate”* smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- S pomočjo rezultatov kontrolne skupine smo potrdili uporabnost testa za razločevanje med rakavimi bolniki in zdravimi preiskovanci.
- Na osnovi primerjave rezultatov med obema skupinama bolnikov smo ugotovili, da serumski test CIA-RECAF ne loči med maligno in benigno spremembo tkiva prostate. V tem primeru ne vemo, ali gre res za benigne vzorce ali so že prisotne atipične proliferacije, ki so v procesu nastanka malignega vzorca.
- Za boljšo reprezentativnost zaključkov bi bilo smiselno raziskavo razširiti na večje število bolnikov in primerjati kemiluminiscenčno metodo s katero drugo metodo merjenja RECAF enot v serumu (npr. RIA) z vključitvijo malignih ter tudi benignih vzorcev.
- Smiselno bi bilo določiti natančnost in točnost metode ter določiti faktorje, ki bi potencialno lahko motili izvedbo analize ter s tem privedli do dvomljivih in potencialno napačnih rezultatov.
- Mejno vrednost bi bilo smiselno določiti na večjem številu zdravih preiskovancev.
- Glede na naše rezultate, PSA izkazuje večjo diagnostično specifičnost in občutljivost kot njegova prosta frakcija.

7 LITERATURA

- 1) Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9. izdaja. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2001.
- 2) Novaković S.: Karcinogeneza – nastanek rakavih celic. *Onkologija* 2006; 2: 99-102.
- 3) Onkološki Inštitut Ljubljana: Rak v Sloveniji 2007. Register Raka Republike Slovenije 2010.
- 4) Hajdinjak T., Zagradišnik B., Kokalj-Vokač N., Kisner K.: Genetski dejavniki in rak prostate (vpliv polimorfizmov C825T v genu GNB3 in D85Y v genu UGT2B15). *Zdravniški vestnik* 2004; 74: 481-4.
- 5) Ovčak Z.: Vloga patologa pri diagnostiki karcinoma prostate. *Radiology and Oncology* 2006; 40 (Suppl. 1): S115-S120.
- 6) Li Y., J. Cozzi P., Russell J. P.: Promising Tumor-Associated Antigens for Future Prostate Cancer Therapy. *Medicinal Research Reviews* 2010; 30: 67-101.
- 7) Dunn K. B., Wagner D. P., Anderson D., Greenwald P.: Molecular Markers for Early Detection. *Seminars in oncology* 2010; 37: 224-242.
- 8) Stephen C., Stroebel G., Heinau M., Lenz A., Roemer A., Lein M., Schnorr D., A. Loening S., Jung K.: The Ratio of Prostate-Specific Antigen (PSA) to Prostate Volume (PSA Density) as a Parameter to Improve the Detection of Prostate Carcinoma in PSA Values in the Range of < 4 ng/ml. *Cancer* 2005; 104: 993-1003.
- 9) Canas B., Cusan L., Gomez J. L., Diamond P., Suburu E. P., Levesque J., Brousseau G., Belanger A., Labrie F.: Evaluation of Prostatic Specific Antigen and

- Digital Rectal Examination as Screening Tests for Prostate Cancer. *The Prostate* 2000; 45:19-35.
- 10) Chatterjee K.S., Zetter R.B: Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncology* 2005; 1(1): 37-50.
 - 11) Shariat F.S., Karam A. J., Margulis V., Karakiewicz I. P.: New blood-based biomarkers for the diagnosis, staging and prognosis of prostate cancer. *British Journal of Urology International* 2007;101: 675-683.
 - 12) Kmetec A.: Benigna hiperplazija prostate. *Farmacevtski vestnik* 2011; 62: 77-80.
 - 13) Lee H. C., Akin-Olugbade O., Kirschenbaum A.: Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2011; 40: 565-575.
 - 14) Kmetec A.: Spletno gradivo za študente medicine.
 - 15) Kundra V., M. Silverman P., F. Matin S., Choi H.: Imaging in Oncology from The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center: Diagnosis, Staging, and Surveillance of Prostate Cancer. *American Journal of Roentgenology* 2007; 189: 830-844.
 - 16) Oblak C.: Zgodnje odkrivanje, zdravljenje in spremljanje bolnikov z rakom prostate. *Radiology and Oncology* 2006; 40 (Suppl 1): S127-S136.
 - 17) Foster C. S., Cornford P., Forsyth L., Djamgoz M. B. A., Ke Y.: The cellular and molecular basis of prostate cancer. *British Journal of Urology* 1999; 83: 171-194.
 - 18) Lovšin M.: Sodobna diagnostika raka prostate. *Onkologija* 2006.

- 19) Bunting S. P.: Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen: beware the biases. *Clinica Chimica Acta* 2002; 315: 71-97.
- 20) Unger A. H., Kane D. R., Fox M. K., Gandhi S., Alzola C., Lamerato L., Newling D., Kumar S.: Relative importance of PSA in prostate cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2005; 25: 238-245.
- 21) Štabuc B.: Rak pri moških. Zveza slovenskih društev za boj proti raku, Ljubljana, 2005.
- 22) Schoder H. F., Gosselaar C., Roemeling S., Postma R., Roobol J. M., Bangma H. C.: PSA and the Detection of Prostate Cancer After 2005. Part 1. *European Association of Urology* 2006; 4: 2-12.
- 23) Hardinf A. M., Theodorescu D: Prostate tumor progression and prognosis:interplay of tumor and host factors. *Urologic Oncology* 2000; 5: 258-264.
- 24) Andriole G., Djuvan B., Fleshner N., Schroder F.: The Case for Prostate Cancer Screening with Prostate-Specific Antigen. *European Urology Supplements* 2006; 3: 737-745.
- 25) [Http://www.mens-hormonal-health.com/stages-of-prostate-cancer.html](http://www.mens-hormonal-health.com/stages-of-prostate-cancer.html).
- 26) Kojima M., J. Babaian R.: Algorithms for Early Detection of Prostate Cancer. *Cancer* 1995; 75:1860-1868.
- 27) Brawer K. M.: How to Use Prostate-Specific Antigen in the Early Detection or Screening for Prostatic Carcinoma. *Cancer journal for clinicians* 2995;45:148-164.

- 28) Herman P. M., Dorsey P., John M., Patel N., Leung R., Tewari A.: Techniques and Predictive Models to Improve prostate Cancer Detection. *Cancer* 2009; 115(13 suppl): 3085-3099.
- 29) Brawer K. M.: Prostate-Specific Antigen. *Seminars in Surgical Oncology* 2000; 80: 3-9
- 30) Demura T., Shinohara N., Tanaka M., Enami N., Chiba H., Togashi M., Ohashi N., Nonomura K., Koyanagi T.: The proportion of Free to Total Prostate Specific Antigen. *Cancer* 1996; 77: 1137-1143.
- 31) Recker F., Kwiatkowski M. K., Piironen T., Pettersson K., Goepel M., Tscholl R.: Free-to-total prostate-specific antigen (PSA) ratio improves the specificity for detecting prostate cancer in patients with prostatism and intermediate PSA levels. *British Journal of Urology* 1998; 81:532-538.
- 32) Stephen C., Cammann H., A. Meyer H., Lein M., Jung K.: PSA and new biomarkers within multivariate models to improve early detection of prostate cancer. *Cancer Letters* 2007; 249: 18-29.
- 33) Young Jung Kim, Sun-Ouch Kim, Kwang Ho Ryu, In Sang Hwang, Eu Chang Hwang, Kyung Jin Oh, Seung Il Jung, Taek Won Kang, Dong Deuk Kwon, Kwangsung Park, Soo Bang Ryu: Prostate Cancer Can Be Detected Even in Patients with Decreased PSA Less than 2.5 ng/ml after Treatment of Chronic Prostatitis. *Korean Journal of Urology* 2011; 52: 457-460.
- 34) Schmid H. P., Prikler L., M. Sturgeon C., Semjonow A.: Diagnosis of Prostate Cancer-The Clinical Use of Prostate Specific Antigen. *Europeas Association of Urology Update Series* 2003; 1: 3-8.
- 35) Miller K., Abrahamsson P. A., Akakura K., Debruyne M. J. F., Evans P. C., Klotz L.: The Continuing Role of PSA in the Detection and Management of Prostate Cancer. *European Urology Supplements* 2007; 6: 327-333.

- 36) Ronan Long, Subhasis Giri, Sean Diver, Lorna Duddy, Declan Mckeown, Kevin Moran: Effect of prostate manipulation on the serum levels of complexed prostate-specific antigen and total prostate-specific antigen. *International Journal of Urology* 2006; 13: 947-950.
- 37) Brawer K. M.: Prostate-Specific Antigen: Current Status. *A Cancer Journal for Clinicians* 1999; 49: 264-281.
- 38) Parekh J.D., Pauler Ankerst D., Troyer D., Srivastava S., Thompson M.I.: Biomarkers for Prostate Cancer Detection. *The Journal of Urology* 2007; 178: 2252-2259.
- 39) Schoder H. F., Canter H. B., Wolters T., Van den Bergh C. N. R, Gosselaar C., H. Bangma C., J. Roobol M.: Early Detection of Prostate Cancer in 2007; Part1: PSA and PSA Kinetics. *European Urology* 2007; 53: 468-477.
- 40) Pruthi R. S.: The dynamics of prostate-specific antigen in benign and malignant disease of the prostate. *British Journal of Urology International* 2000; 86: 652-685.
- 41) Pamies J. R., Crawford R. D.: Tumor Markers. *Cancer Screening and Diagnosis* 1996; 80: 185-198.
- 42) Korfage J. I., Van den Bergh C. N. R., Essik-Bot M. L.: Deciding on PSA screening-Quality of current consumer information on the Internet. *European Journal of Cancer* 2010; 46: 3073-3081.
- 43) Morgan O. T., Mcleod G. D., Leifer S. E., Moul W. J., Murphy P. G.: Prospective Use of Free PSA to Avoid Repeat Prostate Biopsies in Men With Elevated Total PSA. *The Prostate Supplement* 1996; 7: 58-63.

- 44) Williams A. S., Singh P., Isaacs T. J., Denmeade R. S.: Does PSA Play a Role as a Promoting Agent During the Initiation and/or Progression of Prostate Cancer? *The Prostate* 2007; 67:312-329.
- 45) Hoffman H. R., Clanon L. D., Chavez M., C. Pierce J.: Using Multiple Cutpoints for the Free-to-total Prostate Specific Antigen Ratio Improves the Accuracy of Prostate Cancer Detection. *The Prostate* 2002; 52: 150-158.
- 46) Manabu Kuriyama: Prostate-specific antigen as a tumor marker in prostate cancer. *International Journal of Urology* 1994; 1: 99-113.
- 47) Miyakubo M., Ito K., Yamamoto T., Takechi H., Ohi M., Suzuki K.: Prostate-specific antigen: Its usefulness in the era of multiple-core prostate biopsy. *International Journal of Urology* 2009; 16: 561-565.
- 48) Djavan B., Fong Y. K., Remzi M., Fakhari M., Marberger M.: New Serum and Urinary Markers for Prostate Cancer Detection in the New Millennium. *European Urology Supplements* 2004; 3: 25-32.
- 49) Hideyasu Matsuyama, Yoshikazu Baba, Gen-Ichiro Yamakawa, Norio Yamamoto, Katsusuke Naito: Diagnostic value of prostate-specific antigen-related parameters in discriminating prostate cancer. *International Journal of Urology* 2000; 7: 409-414.
- 50) Catalona W. J., Partin A. W., Slawin K. M., Brawer M. K., Flanigan R. C., Patel A., Richie J. P., DeKernion J. B., Walsh P. C., Scardino P. T., Lange P. H., Subong E. N., Parson R. E., Gasior G. H., Loveland K. G., Southwick P. C.: Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *The journal of the American Medical Association* 1998; 279(19): 1542-7.

- 51) Bunting S. P., DeBoer G., Choo R., Danjoux C., Klotz L., Fleshner N.: Intraindividual variation of PSA, free PSA and complexed PSA in a cohort of patients with prostate cancer managed with watchful observation. *Clinical Biochemistry* 2002; 35: 471-475.
- 52) Bratslavsky G., A. G. Fisher H., P. Kaufman R., Jr., Voskoboynik D., Nazeer T., M. Mian B.: PSA-related markers in the detection of prostate cancer and high-grade disease in the contemporary era with extended biopsy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2008; 26: 166-170.
- 53) OncoPet Serum RECAF Test Results Using Canine Serum Specimens, OncoPet Diagnostics Inc.
- 54) http://en.wikipedia.org/wiki/Receiver_operating_characteristic
- 55) Kazuo Gonji, Masashi Nomi, Shin Egawa, Joichi Morisue, Atsushi Takenaka, Masayuki Okamoto, Makoto Ohori, Akio Fujii: Detection of Prostate Carcinoma Using Prostate Specific Antigen, Its Density, and the Density of the Transition Zone in Japanese Men with Intermediate Serum Prostate Specific Antigen Concentrations. *Cancer* 1997; 79: 1969-1976.
- 56) Djavan B., Kit Fong Y., Remzi M., Fakhari M., Marberger M.: New Serum and Urinary Markers for Prostate Cancer Detection in the New Millennium. *European Urology Supplements* 2004; 3: 25-32.
- 57) Gretzer B. M., W. Partin A.: PSA Levels and the probability of prostate Cancer on Biopsy. *European urology Supplements* 2002; 1: 21-27.
- 58) Cortesi M., Fridman E., Volkov A., Sh. Shilstein S., Chechik R., Breskin A., Vartsky D., Raviv G., Ramon J.: New Prospective for Non-Invasive Detection, Grading, Size Evaluation, and Tumor Location of Prostate Cancer. *The prostate* 2010; 70: 1701-1708.

- 59) Freedland J. S., Hotaling M. J., Fitzsimons N., Presti C. J. Jr., Kane J. C., Terris K. M., Aronson J. W., Amling L. C.: PSA in the New Millennium: A Powerful Predictor of Prostate Cancer prognosis and Radical Prostatectomy Outcomes - Results from the SEARCH Database. *European Urology* 2008; 53: 758-766.
- 60) Epstein I. J.: An Update of the Gleason Grading System. *The Journal of Urology* 2010; 183: 433-440.
- 61) Haggman J. M., Macoska A. J., Wojno J. K., Oesterling E. J.: The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: clinical issues. *The Journal of Urology* 1997; 158:12-22.
- 62) Teba F., Martin R., Gomez V., M. Herranz L., Santamaria L.: Cell proliferation and volume-weighted mean nuclear volume in high-grade PIN and adenocarcinoma, compared with normal prostate. *Image Analysis & Stereology* 2007; 26: 93-99.
- 63) Bratuš D., Kolenc A., Hlebič G.: Naše izkušnje z zdravljenjem omenjenega karcinoma prostate z radikalno retropubično prostatektomijo. *Zdravniški vestnik* 2003; 72: Supl. I: 65-66.
- 64) Jagodič K., Erklavec M., Poleko S., Korošec-Jagodič H., Bizjak I.: Zapleti radikalne prostatektomije: Naše izkušnje. *Zdravniški vestnik* 2007; 76: I-35-38.
- 65) Duffy J. M.: Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *European Journal of Internal Medicine* 2007;18:175-184.
- 66) Novakovič S.: Tumorski označevalci v klinični onkologiji. *Onkologija/pregled*, Ljubljana, 2000.

- 67) Gadducci A., Cosio S., Carpi A., Nicolini A., Riccardo Genazzani A.: Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 24-38.
- 68) Montie E. J., Meyers E. S.: Defining the ideal tumor marker for prostate cancer. *Urologic Clinics of North America* 1997; 24: 247-252.
- 69) Makarov V. D., Carter B.: The Discovery of prostate Specific Antigen as a Biomarker for the Early Detection of Adenocarcinoma of the Prostate. *The Journal of Urology* 2006; 176: 2383-2385.
- 70) Loeb S., Catalona J. W.: Prostate-specific antigen in clinical practice. *Cancer Letters* 2007; 249: 30-39.
- 71) Abelov G. I., Lazarevich N. L.: Alpha-Fetoprotein (AFP): Solved and Unsolved Problems. *The McGill Journal of Medicine* 1996; 2: 127-134.
- 72) Tsuboi S., Taketa K., Nouse K., Fujikawa T., Manabe K., Ohmori H., Higashi T., Shiratori Y.: High Level of Expression of α -Fetoprotein Receptor in Gastric Cancers. *Tumor Biology* 2006; 27: 283-288.
- 73) Sell S.: Alpha-Fetoprotein, Stem Cells and Cancer: How Study of the Production of Alpha-Fetoprotein during Chemical Hepatocarcinogenesis Led to Reaffirmation of the Stem Cell Theory of Cancer. *Tumor Biology* 2008; 29: 161-180
- 74) Gillespie R. J., Uversky N.V.: Structure and function of α -Fetoprotein: a biophysical overview. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1480: 41-56.
- 75) Mitsuhashi N., Kobayashi S., Doki T., Kimura F., Shimizu H., Yoshidome H., Ohtsuka M., Kato A., Yoshitomi H., Nozawa S., Furukawa K., Takeuchi D., Suda K., Miura S., Miyazaki M.: Clinical significance of α -Fetoprotein:

- involvement in proliferation, angiogenesis, and apoptosis of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008; 23:189-197.
- 76) Wang X. W., Xu B.: Stimulation of tumor-cell growth by alpha-fetoprotein. *International Union Against Cancer* 1998; 75: 296-599.
- 77) Sen Li M, Feng Li P, Peng He S, Guang Du G, Li G: The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel7402 cell line. *World Journal of Gastroenterology* 2002; 8: 469-475.
- 78) Xiao-Yan Liu, Dan Dong, Peng Sun, Jun Du, Luo Gu, Ying-Bin Ge: Expression and location of α -Fetoprotein during rat colon development. *World Journal of Gastroenterology* 2009; 15(14): 1738-1743.
- 79) Newby D., Dalgiesh G., Lyall F., Aitken D.: Alphafetoprotein and Alphafetoprotein Receptor Expression in the Normal Human Placenta at Term. *Placenta* 2005; 26: 190-200.
- 80) Xiixin Li, Sarah Alexander: Hereditary Persistence of Alpha-Fetoprotein. *Pediatric Blood & Cancer* 2009; 52: 403-405.
- 81) Ehrlich Y., Beck D. W. S., Foster S. R., Bihrlé R., Einhorn H. L.: Serum tumor markers in testicular cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2010.
- 82) Moro R., Tcherkassova J., Song E., Shen G., Moro R., Schmid R., Hu Y., Kummer A., Chen C.: A New Broad-Spectrum Cancer Marker. *Nj: ivd Technology*; 2005. (<http://www.ivdtechnology.com/article/new-broad-spectrum-cancer-marker>).
- 83) Tcherkassova J., Abramovich C., Moro R., Chen H., Schmit R., Gerber A., Moro R.: Combination of CA 125 and RECAF biomarkers for early detection of ovarian cancer. *Tumor biology* 2011; 32: 831-838.

- 84) [Http://www.biocurex.com/recaf.php](http://www.biocurex.com/recaf.php).
- 85) [Http://www.pathguy.com/recaf_review.pdf](http://www.pathguy.com/recaf_review.pdf).
- 86) Uriel N., Naval J., Laborda J.: Alpha-Fetoprotein-mediated Transfer of Arachidonic Acid into cultured Cloned Cells Derived from a Rat Rhabdomyosarcoma. *The Journal of Biological Chemistry* 1987; 262: 3579-3587.
- 87) Uriel J., Trojan J., Moro R., Pineiro A.: Intracellular uptake of α -fetoprotein: A marker of neural differentiation. *Annals of the New York Academy of sciences* 1983; 417: 321-329.
- 88) Hajeri-Germond M., Naval J., Trojan J., Uriel J.: The uptake of alpha-fetoprotein by C-1300 Mouse neuroblastoma cells. *British Journal of Cancer* 1985; 51: 791-797.
- 89) Mizejevski G. J.: Review of the putative cell-surface receptors for alpha-fetoprotein: identification of a candidate receptor protein family. *Tumor biology* 2011; 32: 241-258.
- 90) Villacampa M. J., Moro R., Naval J., Faily-Crepin C., Lampreave F., Uriel J.: Alpha-fetoprotein receptors in a human breast cancer cell line. *Biochemical and Biophysical research Communications* 1984; 122: 1322-1327.
- 91) Naval J., Villacampa M. J., Goguel A. F., Uriel J.: Cell-type specific receptors for alpha-fetoprotein in a mouse T-lymphoma cell line. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 1985; 82: 3301-3305.

- 92) Suzuki Y., Zeng Q. Y. C., Alpert E.: Isolation and Partial Characterization of a Specific Alpha-Fetoprotein Receptor on Human Monocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 1992; 90: 1530-1536.
- 93) Moro R., Tamaoki T., Wegmann T. G., Longenecker B. M., Laderoute M. P.: Monoclonal Antibodies Directed against Widespread Oncofetal Antigen: The Alpha-Fetoprotein Receptor. *Tumor Biology* 1993; 14: 116-130.
- 94) Moro R., Tcherkassova J., Song E., Shen G., Moro R., Schmid R., Hu Y., Kummer A., Chen C.: RECAF, A New Broad-Spectrum Cancer Marker. Jan 2011 ([Http://www.docstoc.com/docs/69286420/RECAF--A-New-Broad-Spectrum-Cancer-Marker](http://www.docstoc.com/docs/69286420/RECAF--A-New-Broad-Spectrum-Cancer-Marker)).
- 95) Uriel J., Jose Villacampa M., Moro R., Naval J., Faily-Crepin C.: Uptake of Radolabeled α -fetoprotein by Mouse Mammary carcinomas and Its usefulness in Tumor Scintigraphy. *Cancer Research* 1984; 44: 5314-5319.
- 96) Biocurex: Novel, Widespread Cancer Marker to Improve Cancer Diagnostics. April 2008 ([Http://www.equities.com/research/crystal-research/pdfs/BOCX_EIO_04-11-08.pdf](http://www.equities.com/research/crystal-research/pdfs/BOCX_EIO_04-11-08.pdf)).
- 97) Dowel B., Frost S., Tcherkassova J., Gerber A., Moro R., Moro R.: Chemiluminiscent assay (CIA) for the receptor of alpha fetoprotein (RECAF) to separate cancer from normal sera. *Tumor Biology: Cancer Research, Tumor Markers, Clinical Oncology*; The 35th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 2007.
- 98) [Http://www.genoprice.com/BioCurexBrochure.pdf](http://www.genoprice.com/BioCurexBrochure.pdf).
- 99) Moro R., Gulyaeva-Tcherkassova J., stieber P.: Increased alpha-fetoprotein receptor in the serum of patients with early-stage breast cancer. *Cancer Biomarkers* 2012; 19: e1-e8.

- 100) Stura A. E., Muller H. B., Bossus M., Michel S., Jolivet-Reynaud C., Ducancel F.: Crystal structure of human prostate-specific antigen (PSA) in a sandwich antibody complex. *Journal of Molecular Biology* 2011.
- 101) [Http://emedicine.medscape.com/article/457394-overview](http://emedicine.medscape.com/article/457394-overview).
- 102) Alkiviades K. Gregorakis, Dimitrios Malovrouvas, Stefanos Stefanakis, Konstantina Petraki, Andreas Scorilas: Free/Total PSA (F/T ratio) kinetics in patients with clinically localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Clinica Chimica Acta* 2005; 357: 198-201.
- 103) Anderson J.: Does PSA Testing Influence the Natural History of Prostate Cancer? *European Urology Supplements* I 2002; 3-10.
- 104) New Current Protocol CIA Onco Pet Serum RECAF Test, Jan. 2011.
- 105) [Http://en.wikipedia.org/wiki/Chemiluminescence](http://en.wikipedia.org/wiki/Chemiluminescence).
- 106) [Http://en.wikipedia.org/wiki/TCEP](http://en.wikipedia.org/wiki/TCEP).
- 107) Dowell B., Frost S., Tcherkassova J., Gerber A., Moro R.: Development of a Chemiluminiscent Assay (CIA) for the Receptor of Alpha Fetoprotein (RECEF) to Separate Cancer from Normal Sera. Congress of the International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine, September 15.-19., 2007, Prague, Czech Republic ([Http://www.biocurex.com/media/posters/Abbott_poster.pdf](http://www.biocurex.com/media/posters/Abbott_poster.pdf)).
- 108) Weeks I., Beheshti I., McCapra F., Campbell A. K., Woodhead J. S.: Acridinium Esters as High-Specific-Activity Labels in Immunassay. *Clinical Chemistry* 1983; 29: 1474-1479.
- 109) Adamič Š.: Temelji biostatistike, 2. izdaja, Medicinska fakulteta univerze v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1989.

- 110) [Http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/ADV/910-002.pdf](http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/ADV/910-002.pdf)
- 111) [Http://en.wikipedia.org/wiki/Logit](http://en.wikipedia.org/wiki/Logit)
- 112) [Http://old.iupac.org/goldbook/L03613.pdf](http://old.iupac.org/goldbook/L03613.pdf)
- 113) [Http://sl.wikipedia.org/wiki/Kvartil](http://sl.wikipedia.org/wiki/Kvartil)
- 114) [Http://mlsc.lboro.ac.uk/resources/statistics/Mannwhitney.pdf](http://mlsc.lboro.ac.uk/resources/statistics/Mannwhitney.pdf)
- 115) Nachar N.: The Mann-Whitney U: A Test for Assessing Whether Two Independent Samples Come from the Same Distribution. Tutorials in Quantitative Methods for Psychology 2008; 4: 13-20
- 116) [Http://en.wikipedia.org/wiki/Reference_range](http://en.wikipedia.org/wiki/Reference_range)
- 117) [Http://en.wikipedia.org/wiki/Mann%E2%80%93Whitney_U](http://en.wikipedia.org/wiki/Mann%E2%80%93Whitney_U)