

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA BANOVEC

**POMEN DOLOČANJA PROSTATNO
SPECIFIČNEGA PROANTIGENA PRI
BOLNIKI S KARCINOMOM PROSTATE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA BANOVEC

**POMEN DOLOČANJA PROSTATNO
SPECIFIČNEGA PROANTIGENA PRI
BOLNIKI S KARCINOMOM PROSTATE**

**DIAGNOSTIC VALUE OF PROSTATE
SPECIFIC PROANTIGEN IN PATIENTS WITH
PROSTATE CANCER**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (Poliklinika).

Meritve so bile izvedene v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Največje zahvale namenjam mami in sestri za vso podporo, motivacijo in vzpodbudne besede v času študija. Zahvaljujem se tudi prijateljem, ki so mi skozi študijska leta stali ob strani.

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

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	PROSTATA	1
1.1.1	Anatomija prostate.....	1
1.1.2	Histologija prostate.....	2
1.2	BOLEZNI PROSTATE.....	3
1.2.1	Benigna hiperplazija prostate	3
1.2.2	Prostatitis	5
1.2.3	Rak prostate	5
1.2.3.1	Dejavniki tveganja.....	7
1.2.3.2	Klinično izražanje raka prostate	7
1.2.3.3	Opredelitev stopnje razširjenosti tumorja.....	8
1.2.3.4	Histološki tip tumorja	9
1.2.3.5	Stopnja diferenciacije tumorja.....	9
1.3	DIAGNOZA KARCINOMA PROSTATE	10
1.3.1	DRE in določanje serumske koncentracije PSA	10
1.3.2	Transrektalni ultrazvok (TRUZ).....	12
1.3.3	Biopsijski vzorci	12
1.4	TUMORSKI OZNAČEVALCI.....	13
1.4.1	Specifičnost in občutljivost tumorskih označevalcev.....	14
1.4.2	Delitev tumorskih označevalcev.....	14
1.4.3	Prostatno specifični antigen.....	15
1.4.4	Prostatno specifični proantigen	17
1.4.5	phi (Prostate Health Index).....	20
2	NAMEN DELA.....	22
3	MATERIALI IN METODE	23

3.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE PSA, PROSTEGA PSA IN [-2]proPSA.....	23
3.1.1	Princip metode.....	23
3.1.2	Materiali	23
3.1.3	Postopek testiranja.....	24
3.1.4	Izračun rezultatov	25
3.2	STATISTIČNE METODE	25
3.2.1	Mere variabilnosti.....	25
3.2.1.1	Kvartilni diagram.....	25
3.2.2	Testiranje normalnosti porazdelitve	26
3.2.2.1	Shapiro-Wilkov test.....	27
3.2.3	Neparametrični testi za ugotavljanje razlik med dvema povprečnima vrednostima za neodvisne vzorce	28
3.2.3.1	Mann-Whitneyev U test in Wilcoxonov test vsote rangov.....	28
3.2.4	Določanje referenčnega intervala	29
3.2.5	Specifičnost in občutljivost	30
3.2.6	ROC krivulja in AUC	31
3.2.6.1	ROC krivulja	31
3.2.6.2	AUC.....	32
3.2.7	Metoda za določitev moči povezave med spremenljivkami.....	33
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	34
4.1	TESTIRANJE.....	34
4.2	PRIMERJAVA STATISTIČNIH PARAMETROV MED SKUPINAMA.....	37
4.2.1	Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov meritev tumorskega označevalca [-2]proPSA.....	37
4.2.2	Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov parametra phi.....	38
4.2.3	Določitev porazdelitve podatkov.....	39

4.3	UGOTAVLJANJE RAZLIK V KONCENTRACIJI [-2]proPSA IN V VREDNOSTIH PARAMETRA phi MED SKUPINO 1 IN SKUPINO 2	42
4.3.1	Ugotavljanje razlik v koncentraciji [-2]proPSA med skupinama.....	42
4.3.2	Ugotavljanje razlik v vrednostih parametra phi med skupinama	43
4.4	DOLOČANJE REFERENČNE VREDNOSTI ZA TUMORSKI OZNAČEVALEC [-2]proPSA IN ZA PARAMETER phi	44
4.4.1	Meritve	44
4.4.2	Določanje porazdelitve podatkov kontrolne skupine	45
4.4.3	Izračun referenčnega intervala.....	46
4.5	DOLOČANJE SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI.....	48
4.5.1	Določanje specifičnosti in občutljivosti tumorskega označevalca [-2]proPSA in parametra phi glede na kontrolno skupino	48
4.6	SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST GLEDE NA NEMALIGNE BOLEZNI PROSTATE.....	55
4.6.1	Specifičnost in občutljivost tumorskega označevalca [-2]proPSA	55
4.6.2	Specifičnost in občutljivost celokupne koncentracije PSA	56
4.6.3	Specifičnost in občutljivost deleža prostega PSA	57
4.6.4	Specifičnost in občutljivost phi	59
4.7	DOLOČEVANJE SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI NA SKUPINI BOLNIKOVI, KATERIH KONCENTRACIJA PSA SE NAHAJA V »SIVI CONI«	60
4.8	MOČ POVEZAVE MED SPREMENLJIVKAMI (KORELACIJA)	61
5	SKLEP	62
6	LITERATURA	63

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC.....	površina pod krivuljo (angl. Area under the curve)
BHP.....	benigna hiperplazija prostate
BPSA	benigna oblika prostatičnega specifičnega antigena
DRE.....	digitalno rektalni pregled
HGPIN.....	prostatična intraepitelijska neoplazija visoke stopnje (angl. High grade prostatic intraepithelial neoplasia)
phi.....	prostatični indeks (angl. Prostate Health Index)
PSA.....	prostatični specifični antigen
proPSA.....	prostatno specifični proantigen
[-2]proPSA.....	oblika prostatno specifičnega proantigena z dvema dodatnima aminokislinama
PSAD.....	PSA gostota (angl. PSA Density)
PSADTZ.....	PSA gostota prehodne cone (angl. PSA density transition cone)
PSAV.....	PSA hitrost (angl. PSA velocity)
PSAVDT.....	hitrost podvojitve PSA (angl. PSA velocity double time)
RLU.....	relativna svetlobna enota (angl. Relative light unit)
SSS.....	starostno standardizirana stopnja
TRUZ.....	transrektalen ultrazvok (angl. Transrectal ultrasound)
TURP.....	trasuretralna resekcija (angl. Transurethral resection)

POVZETEK

Za zgodnjo diagnostiko karcinoma prostate je še vedno daleč najbolj uporabljen tumorski označevalec PSA in njegova prosta oblika. V zadnjem desetletju pa se pospešeno išče tumorski označevalec, ki bi izboljšal delež zgodaj diagnosticiranih bolnikov in delež bolnikov z dobro diferenciranim lokaliziranim tumorjem. V diplomski nalogi smo se osredotočili na nov tumorski označevalec [-2]proPSA, ki je ena izmed oblik proPSA in na njegovo izpeljanko phi (Prostate Health Index). Uporabljali smo meritve skupine pacientov s karcinomom prostate, skupine pacientov z nemalignimi boleznimi in kontrolne skupine. Iz meritev smo nato še izračunali phi. Diagnoza je bila potrjena s histološko analizo. V prvem delu smo poskušali ugotoviti, ali obstaja razlika v koncentraciji tumorskega označevalca [-2]proPSA in phi med skupino pacientov s karcinomom prostate in skupino pacientov z nemalignimi boleznimi. Dokazali smo, da razlika ni statistično značilna. Iz podatkov kontrolne skupine smo nato določili referenčno mejo za [-2]proPSA (0,148 ng/l) in phi (0,319), s pomočjo katere smo nadalje izračunali specifičnost in občutljivost pri razlikovanju med kontrolno skupino in skupino bolnikov s karcinomom. Tumorski označevalec [-2]proPSA se je izkazal kot zelo dober, s specifičnostjo 100 % pri 73,9 % občutljivosti. S kombiniranjem različnih vrednosti specifičnosti in občutljivosti smo poskušali najiti tudi najbolj optimalno referenčno vrednost. Le ta bi po naših izračunih znašala 0,101 ng /L. S tem bi na račun manjše specifičnosti lahko povečali občutljivost in bi tako obe znašali okrog 80 %. Klinična uporabnost [-2]proPSA in phi v ločevanju med skupino bolnikov s karcinomom prostate in kontrolno skupino se je izkazala kot zelo dobra (AUC=0,821, $p<0,05$; AUC=0,824, $p<0,05$).

V drugem delu smo enako ponovili s primerjavo skupine bolnikov s karcinomom in skupine pacientov z nemalignimi boleznimi, kjer smo prišli do slabših rezultatov. Tako tumorski označevalec [-2]proPSA kot phi sta z nizko vrednostjo AUC pokazala, da nista primerna za ločevanje med bolniki s karcinomom prostate in bolniki z nemalignimi boleznimi. Veliko bolj zanesljiv se je pokazal tumorski označevalec PSA z vrednostjo AUC 0,817. V tretjem delu smo določili AUC za bolnike, katerih koncentracije PSA spadajo na podlagi meritev PSA v ti. območje diagnostične »sive cone«. Tudi tukaj se niti [-2]proPSA niti phi nista izkazala za tumorska označevalca, ki bi bila primerna za ločevanje med bolniki s karcinomom in bolniki z nemalignimi boleznimi.

Ključne besede: karcinom prostate, tumorski označevalec, [-2]proPSA, phi

ABSTRACT

For the early diagnosis of prostate cancer is still by far the most used tumor marker PSA and free PSA. However, in the last decade accelerated search for a new tumor marker which would improve % of early diagnosed patients and % of patients with good differentiated localised tumor. In our study we focused on new tumor marker [-2]proPSA and its derivative phi (Prostate Health Index). We used measurements of group of patients with prostate cancer, group of patients with non-malignant diseases and control group. Diagnosis was confirmed with histological analysis.

In the first part we tried to determine if there is a difference between group 1 and group 2. We proved there is no statistical significant difference. Furthermore, we used data from control group to calculate reference value for [-2]proPSA (0,148 ng/l) and phi (0,319). With these two values we calculated specificity and sensitivity in differentiating between control group and group of patients with prostate cancer. Tumor marker proPSA has proved as very good, with 100 % specificity at 73,9 % sensitivity. Combining different values of specificity and sensitivity we tried to determine optimal reference value. This value would be 0,1005 ng/l, which would increase sensitivity and lower specificity. Both would be around 80 %. Clinical usefulness of proPSA and phi in differentiating between group 1 and control group was proved as very good (AUC=0,8205, $p<0,05$; AUC=0,824, $p<0,05$).

In second part we repeated the same process comparing group of patients with cancer and group of patients with non-malignant diseases. Here we got worse results. Both [-2]proPSA and phi showed that they are not suitable for differentiating between these groups, because AUC was very low (AUC=0,639, AUC=0,6144). PSA has proved to be much more reliable (AUC= 0,8170). In third part we determined AUC on the basis of PSA values which belong in a so-called »grey area«. Here neither [-2]proPSA nor phi did not proved to be suitable for differentiating between patients with cancer and patients with non-malignant diseases.

Key words: prostate cancer, tumor marker, [-2]proPSA, phi

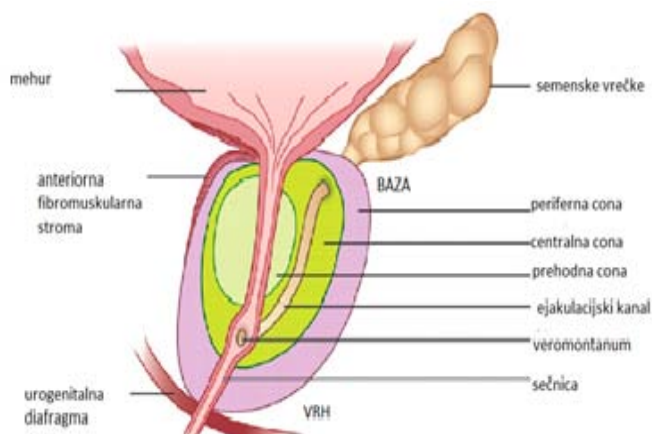
1 UVOD

1.1 PROSTATA

1.1.1 Anatomija prostate

Prostata je sekundarni moški spolni organ. Razvije se v pretinu, ki razdeli prvotni urogenitalni sinus na mehur in debelo črevo. V puberteti pod vplivom testosterona dozori, njena teža doseže okoli 20 g (1). Makroskopsko opazimo pri prostati tri, včasih štiri lobuse: stranska dva in srednjega, včasih tudi zgornjega (2). Po McNealu, ki je utemeljil sodobne poglede na anatomijo in histologijo prostate, le to delimo na 3 glavne žlezne regije/cone, in sicer periferno, centralno in prehodno. Poleg teh pa je sestavljena tudi iz več nežleznih regij, zgoščenih v anteromedialnem delu prostate. *Periferna cona* sestavlja 70 % žleze prostate. Oblikovana je kot disk tkiva, katerega izvodila vodijo lateralno od uretre ter lateralno in distalno od verumontanuma. *Centralna cona* sestavlja 25 % žleze prostate. Oblikovana je kot piramida z bazo na vratu mehurja in vrhom na veromontanumu. Izvodila centralne cone se pojavijo blizu odprtine ejakulatornega voda in jim sledijo proksimalno, nato pa se v bližini prostatičnega centra lateralno razvejajo. Lateralni del se združi s proksimalnim delom periferne cone. *Prehodna cona* je sestavljena iz dveh enakih delov postavljenih lateralno na uretro v sredini žleze. Apikalni del je bogat s prečnoprogastimi mišicami in mišicami pelvične prepone. Ta del je odgovoren za nehotene funkcije sfinkterja. Distalni del prehodnega dela prostate pa ima pomembno vlogo pri hotenih funkcijah sfinkterja. 70 % karcinoma prostate vznikne v perifernem delu, medtem ko se hiperplazija razvije v centralnem delu žleze (slika 1) (3).

Celotna prostata je ovita s fibroznim tkivom, ki prostato obdaja v obliki kaspule. Gre za sloj, ki ločuje prostatično stromo in zunajprostatično maščobo. Obdaja celotno prostato, vendar je tanjša na vrhu prostate in na mestu vstopa ejakulatornih vodov v prostato (4). Ta ovoj okoli prostate ni povsem jasno anatomsko opredeljen in ga ne moremo primerjati s kapsulo jeter ali ledvic (3). Pri hiperplaziji prostate preprečuje širjenje prostate v okolico, zato se pritisk prenaša na prostatični del sečnice in jo utesnjuje (1). Kapsula je tudi pomembna pregrada pri širjenju karcinoma izven organa, preraščanje tumorskega tkiva skozi njo pa je posledično pomemben diagnostičen dejavnik (3).

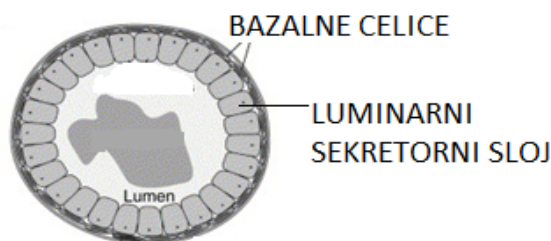


Slika 1: Anatomija prostate (3)

Osnovna funkcija prostate je transport, ohranitev vitalnosti, gibljivost spermijev in antibiotska zaščita (2). Prostatična tekočina je rahlo kisla s $\text{pH}=6,4$ in predstavlja približno 20 % semenske tekočine. Vsebuje spermin, spermidin, prostaglandine, cink, citronske kisline, imunoglobuline, fosfataze in proteaze (5). Naloga proteaz je proteoliza, ki je tudi glavna funkcija prostatičnih izločkov. Najbolj preiskovana med vsemi proteazami je prostatno specifičen antigen (PSA) (2).

1.1.2 Histologija prostate

Vsako izvodilo prostate je sestavljeno iz dveh slojev celic, luminarne sekretorne sloja in spodaj ležečega sloja bazalnih celic. Predvsem pri starejših moških najdemo v lumnu eozinofilne skupke, imenovane tudi *corpora amylacea*, ki povzročajo obstrukcijo lumna prostatičnih izvodil. Vsako izvodilo je obdano z vezivnim tkivom in gladkimi mišicami (fibromuskularna stroma). Stroma sestavlja približno 70 % celotne mase prostate (slika 2) (6).



Slika 2: Prečni prerez izvodila prostate (6)

1.2 BOLEZNI PROSTATE

1.2.1 Benigna hiperplazija prostate

Benigna hiperplazija prostate (BHP) je nemaligno povečanje prostate, za katero so značilne težave pri zadrževanju urina, težave pri začetku uriniranja, nepopolno praznjenje mehurja, pogostejše uriniranje, pogosto zaustavljanje pretoka med uriniranjem, nočno močenje postelje (nikturija) (7). BHP se razvije le v prehodni coni kot posledica proliferacije gladkih mišic in epiteljskih celic (8).

BHP je urinarno stanje, ki zmanjša kvaliteto življenja in v večini primerov pacient potrebuje zdravniško pomoč. A vendar gre za bolezen, ki jo lahko tako preprečimo kot predvidimo (7). Zaradi splošnega pojava staranja prebivalstva je bolezen vse bolj pogosta in je ena najpogostejših bolezni moških v starosti (9). Prevalenca je ocenjena na 50 % moških do 60. leta starosti in 90 % do 90. leta starosti (10).

Za postavitev diagnoze še niso sprejeti splošno veljavni epidemiološki ali klinični kriteriji. V skladu z nacionalnimi smernicami sodijo v osnovni diagnostični postopek ne glede na to, ali moškega obravnava osebni zdravnik ali urolog, naslednje preiskave (8):

- anamneza o vrsti in trajanju genitourinarnih simptomov,
- ocena simptomov s pomočjo vprašalnikov,
- usmerjeni pregled spodnjega abdomna, genitalij in digitalni rektalni pregled,
- analiza seča,
- določitev vrednosti serumskega kreatinina,
- določitev serumske koncentracije prostatičnega specifičnega antigena,
- ocena zaostalega seča po uriniranju.

Eden od najbolj uporabljenih vprašalnikov je AUASI (angl. American Urological Association Symptom Index), ki je bil prvič omenjen leta 1992 (11). Ima sedem vprašanj, tri od teh se nanašajo na zmožnost zadrževanja urina in štiri na samo uriniranje (12).

Pozneje je nastala lestvica, kateri so dodali vprašanje, s katerim pacienti ocenijo, kako zelo jih motijo prisotne težave v vsakodnevnom življenju (11). Ta vprašalnik je poimenovan IPSS (angl. International Prostate Score System) (slika 3) (9). Skupen seštevek točk do sedem pomeni blage simptome BHP, seštevek med 8 in 19 točk se ovrednoti kot zmerno izraženi simptomi BHP. Vsi rezultati nad skupno 20 točk so ocenjeni kot hudo izraženi

simptomi BPH (13).

Čeprav so simptomi raka prostate in BHP podobni, sam BHP ne povečuje možnosti za raka prostate (12). Razmerje koncentracij prostega s koncentracijo celotnega PSA v serumu je večje pri ljudeh z BHP kot pri tistih z rakom prostate. To je eden od načinov ločevanja med tema dvema boleznima (14).

	Nikoli	Manj kot enkrat na pet uriniranj	Manj kot pri polovici uriniranj	Približno pri polovici uriniranj	Več kot pri polovici uriniranj	Skoraj vedno	Vaš rezultat
Nepopolno izpraznjenje - Kolikokrat v zadnjem mesecu ste imeli občutek nepopolno izpraznjenega mehurja po uriniranju?	0	1	2	3	4	5	
Pogostost - Kolikokrat v zadnjem mesecu ste morali ponovno urinirati manj kot dve uri po prejšnjem uriniranju?	0	1	2	3	4	5	
Prekinitve - Kolikokrat v zadnjem mesecu ste ugotovili, da se je curek urina ustavil, potem pa ste večkrat ponovno začeli urinirati?	0	1	2	3	4	5	
Nuja - Kako težko ste v zadnjem mesecu zadrževali urin?	0	1	2	3	4	5	
Šibek curek - Kolikokrat v zadnjem mesecu ste imeli šibek curek urina?	0	1	2	3	4	5	
Napor - Kolikokrat v zadnjem mesecu ste morali potiskati ali se naprezati, da ste začeli urinirati?	0	1	2	3	4	5	

	Nikoli	Enkrat	Dvakrat	Trikrat	Štirikrat	Pet ali večkrat	Vaš rezultat
Nokturija - Kolikokrat povprečno na noč se zbudite zaradi potrebe po uriniranju?	0	1	2	3	4	5	
Skupni rezultat vprašalnika IPSS							
Kakovost življenja in težave z uriniranjem	Srečno	Zadovoljno	Zmerno zadovoljno	Mešani občutki približno v enaki meri zadovoljen in nezadovoljen	Večinoma nezadovoljno	Nesrečno	Grozno
Kako bi se počutili, če bi morali preostanek življenja živeti s sedanjim stanjem uriniranja?	0	1	2	3	4	5	6

Slika 3: Mednarodni vprašalnik o simptomih prostate (IPSS) (13)

1.2.2 Prostatitis

Prostatitis se nanaša na več kliničnih sindromov, vključujoč dobro definirano akutno in kronično bakterijsko infekcijo, slabo definiran nebakterijski kronični prostatitis in asimptomatsko vnetje prostate (15). Prostatitis največkrat prizadene periferni del prostate, redko sta prizadeta centralni in prehodni del (16). Gre za tretjo najpomembnejšo bolezen prostate, ki večinoma prizadene odrasle moške (17). Za razliko od BHP in raka prostate je prostatitis bolezen, ki jo poznajo vse generacije moških (15). Po NIH (angl. National Institutes of Health) klasifikaciji delimo prostatitis v štiri kategorije (18).

Značilnost akutnega prostatitisa je bakterijska okužba z gram negativnimi bakterijami ali *Staphylococcus aureus*, ki je gram pozitivna bakterija (1,19). Akutni prostatitis povzroči povečano izločanje PSA, ki traja do šest tednov (15).

Le 5 % kroničnega prostatitisa povzročajo bakterijske okužbe (1). Kroničen prostatitis je direktno povezan z benigno hiperplazijo, ne pa z rakom prostate (20).

Pacienti z asimptomatskim prostatitisom so velikokrat brez preteklih bolečin povezanih z uriniranjem, v eksprimatu pa najdemo levkocite in povečano število bakterij (18).

Nebakterijski prostatitis ima značilnosti prostatitisa s številnimi levkociti v eksprimatu prostate. V seču večinoma ne najdemo patogenih bakterij, le včasih bakteriji *Chlamydia trachomatis* ali *Ureaplasma urealyticum* (19).

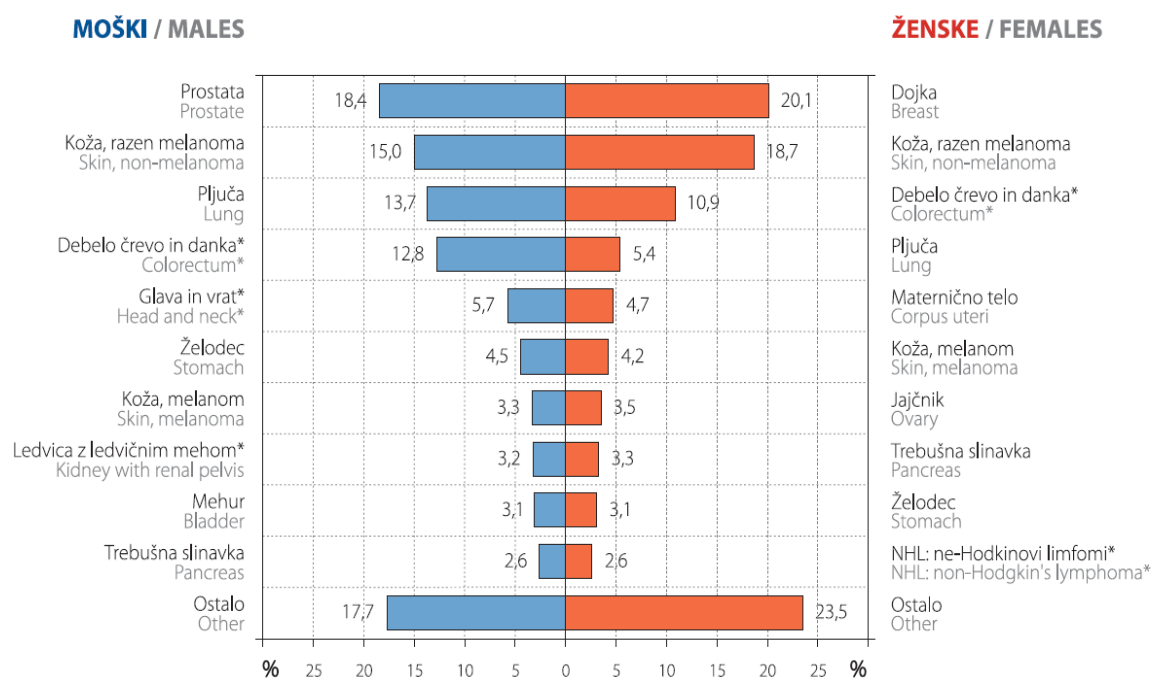
1.2.3 Rak prostate

Rak prostate je z 18,4 % najpogostejši rak pri moških v Sloveniji in ima največji odstotni delež po starostnih skupinah v skupini od 65 do 74 let in sicer 21,6 % vseh rakov (slika 4, slika 5) (21). Rak prostate je v svetu s 13,6 % drugi najpogostejši rak pri moških (22).

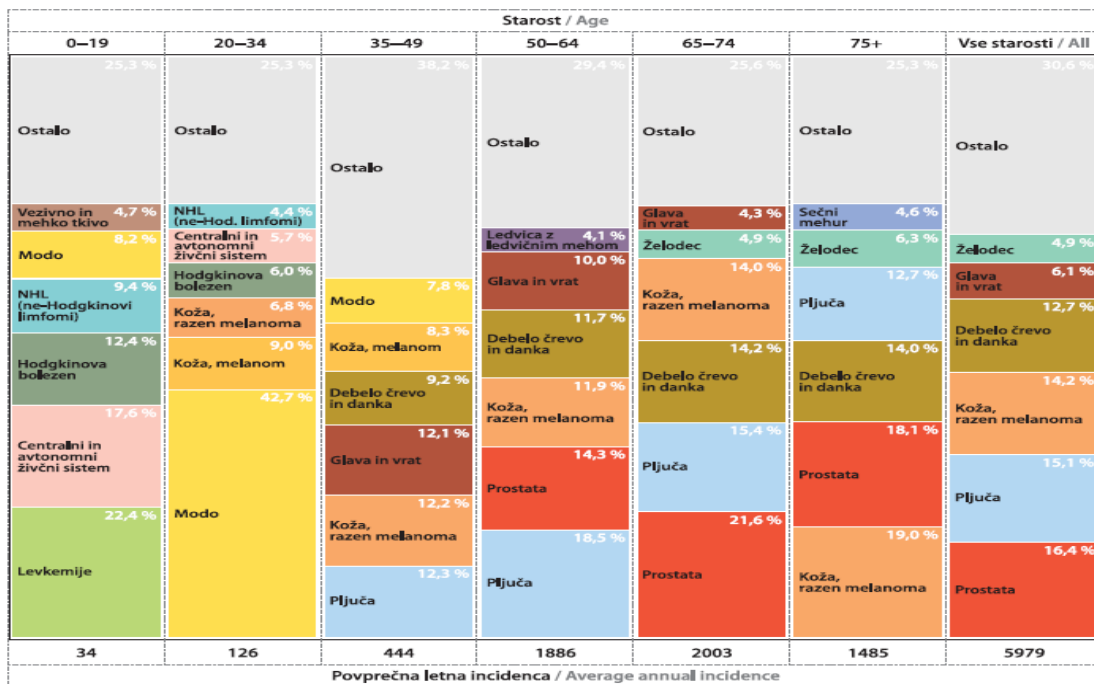
Letna incidenčna stopnja v Sloveniji se je dvignila iz 66,4 na 100.000 moških med leti 1999-2003 na 99,5 na 100.000 moških med leti 2004-2008. Predvidena incidenčna stopnja s 95 % intervalom zaupanja za leto 2011 je 123-141 na 100 000 moških (21). Za primerjavo več populacij, kjer je starostno različna populacija, uporabljamo starostno standardizirane stopnje incidence (SSS). Če primerjamo SSS incidence raka prostate v Sloveniji glede na SSS incidenco v svetu, dobimo sledeče podatke (22):

- SSS incidence v Sloveniji je 62,8 na 100.000 moških
- SSS incidence v svetu je 27,9 na 100.000 moških

Pri nobenem drugem raku incidenca s starostjo ne narašča tako strmo kot pri raku prostate. V zadnjih letih je na registrirano incidenco vplivalo presejanje moških s testom PSA. Ker je raba testa v svetu različno pogosta, za primerjavo ogroženosti posameznih populacij priporočajo določanje umrljivosti zaradi raka prostate namesto incidence (23). Večji delež raka prostate je v razvitih deželah sveta z dolgo pričakovano življenjsko dobo, manjši pa v deželah v razvoju (23). Ocenjeno je, da ima 30 % do 45 % moških s od PSA 4 do 10 µg/ml rak prostate in da ima 20 % do 30 % moških s PSA od 2 do 4 µg /ml rak prostate (24).



Slika 4: Najpogostejše lokacije raka in njihov odstotni delež po spolu, Slovenija 2008 (21)



Slika 5: Odstotni deleži napogostejših rakov po starostnih skupinah, Slovenija 2004–2008 (21)

1.2.3.1 Dejavniki tveganja

Najpomembnejši do sedaj znan dejavnik tveganja za razvoj raka je dednost. Če je za rakom zbolel en bližnji sorodnik (oče ali brat), je 2-krat večja verjetnost za obolenje. Če sta zbolela dva ali več bližnjih sorodnikov, pa je tveganje pet- do enajstkrat večje (25). Poleg tega vpliva tudi doba, v kateri je bil odkrit rak prostate. Če je bil rak prostate pri sorodnikih odkrit zgodaj, je večja verjetnost, da bodo zboleli ostali sorodniki (16).

1.2.3.2 Klinično izražanje raka prostate

Rak prostate se klinično pojavlja v štirih oblikah, in sicer klinični, incidentni, latentni in okulturni rak (3).

Klinični rak

Ugotovimo ga z rektalno digitalno palpacijo, ki pokaže zatrditev in nepravilno oblikovanost prostate. Zvišana je tudi vrednost serumskega PSA. Prav tako dobimo pozitiven rezultat pri ultrazvočni preiskavi. Obvezno je potrebno narediti še biopsijo, s katero potrdimo rak (3).

Incidentni rak

Ugotovijo ga naključno pri pregledu biopsičnega materiala, največkrat v prostatah, ki so bile odstranjene zaradi nodularne hiperplazije (3).

Latentni rak

Naključno ga odkrijemo pri avtopsiji, v času bolnikovega življenja navadno ni bilo nobenih simptomov (3).

Okulni karcinom

Najprej najdemo metastaze v kosteh ali bezgavkah, tumor v prostati (primarni tumor) pa je brez simptomov. Nato merimo koncentracijo PSA v serumu, določujemo pa PSA tudi v tkivu metastaz in sicer imunohistokemično. Če pri slednji preiskavi dobimo pozitiven rezultat, skoraj z gotovostjo sklepamo na prostatični izvor metastaze (3).

1.2.3.3 Opredelitev stopnje razširjenosti tumorja

Za opredelitev razširjenosti tumorja uporabljamo TNM klasifikacijski sistem, s katerim določujemo anatomske obsege raka. Ta sistem temelji na dejstvu, da je izbira zdravljenja in možnost preživetja povezana z obsegom raka na primarnem mestu in njegovo razširjenostjo drugje v telesu. V tem sistemu nam T opredeli obseg raka na primarnem mestu, N prisotnost raka v regionalnih limfnih vozliščih in M prisotnost metastaz izven regionalnih limfnih vozličev. Skupina T je razdeljena v štiri podskupine (26):

-T1,

-T2, ki je naprej razdeljena v 3 podskupine glede na to ali je rak prisoten v enem režnju prostate ali v obeh (T2a, T2b, T2c),

-T3, ki je razdeljena v 2 podskupini glede na to, ali se karcinom razrašča izven kapsule in/ali v semenske vezikle (T3a in T3b)

- T4.

N in M, imata navadno vsaj 2 podskupini, ki sta označeni z 0, kar pomeni, da rak ni prisoten in 1, ki pomeni prisotnost raka (26). V zadnjih letih pri nas odkrijejo že 60 % lokaliziranih rakov, po svetu je ta delež že 70 % in več (27).

Metastaze raka prostate se navadno pokažejo v kosteh ali v bezgavkah (3). Rak prostate zaseva pogosto v kosteh zaradi specifične »angl. seed and soil« lastnosti medsebojnega vpliva celic kosti in raka prostate, poleg tega pa verjetno celice raka prostate selektivno prodirajo v kostnino (28).

1.2.3.4 Histološki tip tumorja

Določujemo tudi histološki tip tumorja, med katerim je z 95 % najpogostejši adenokarcinom. Med vsemi adenokarcinomi je najpogostejši acinarni, ki predstavlja 90 % do 95 % vseh adenokarcinomov prostate (3). Preostalih 5 do 10 % so posebni tipi raka prostate in sicer atrofični adenokarcinom, adenokarcinom prostatičnih izvodil, psevdohiperplastični adenokarcinom, mukozni adenokarcinom, mezenhimski karcinom, ploščatocelični karcinom (29).

1.2.3.5 Stopnja diferenciacije tumorja

Stopnjo diferenciacije tumorja določujemo s Gleasonovim sistemom. Gleasonov sistem je bil prvič objavljen leta 1966, danes pa je že splošno sprejeto, da se stopnjo diferenciacije raka določuje v skladu s tem sistemom (30). Uveljavljen je kot mednarodni standard ocene diferenciacije tumorja (3). V tem sistemu se vsi tumorji razdelijo v pet razredov na podlagi zgradbe žleznih struktur (slika 6). Tumorju se ne določa končna ocena diferenciacije glede na oceno, ki jo določimo enemu vzorcu, ampak glede na vsoto, ki upošteva primarni in sekundarni vzorec glede na obseg (31). Torej seštejemo oceno 2 vzorcev, ki sta po obsegu največja in zato ocena po Gleasonu ne more znašati manj kot 2 točki in ne več kot 10 točk. Če v odvzetem tkivu tumorja najdemo le en vzorec, se ta pomnoži z dva, da dobimo končno oceno (32).

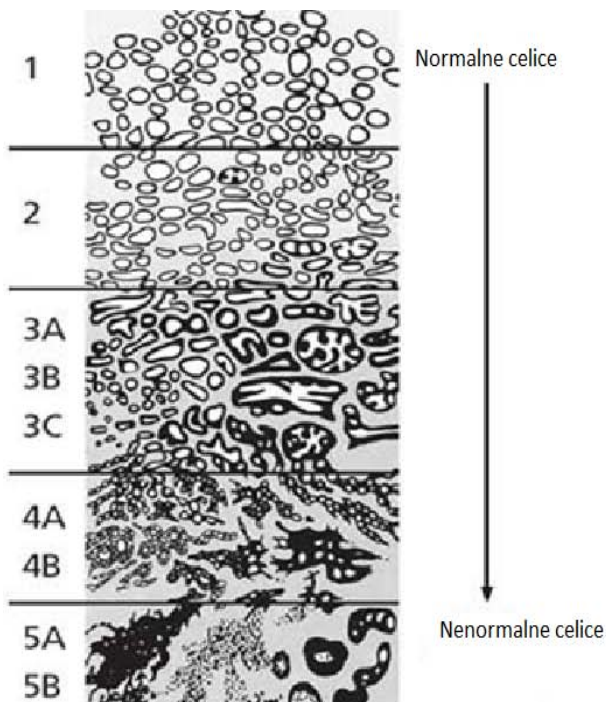
Glede na Gleasonovo oceno so karcinomi razvrščeni v več skupin (3):

- Gleason 2-4 dobro diferencirani karcinom
- Gleason 5-7 zmerno diferencirani karcinom
- Gleason 8-10 slabo diferencirani karcinom

Tkivo karcinoma prostate je velikokrat bolj heterogeno in zato lahko pri pregledu tkiva najdemo več kot dva različna vzorca. Če pri pregledu tkiva odvzetega z radikalno prostatektomijo opazimo manj kot 5 % delež vzorca, ki spada v razred z Gleasonovo oceno 4 ali 5, je potrebno tudi to omeniti v histološkem poročilu, ker vpliva na patološko stopnjo in verjetnost napredovanja raka (32).

Pacient s karcinomom z Gleasonovo oceno nižjo od 6 ima dobro prognozo, ocena od 8 do 10 pa pomeni slabo prognozo za pacienta (33). Nekatere študije so pokazale, da je pri pacientih z Gleasonovo oceno 7, kjer je primarna (največji vzorec po obsegu) Gleasonova

ocena 4 (4 +3=7) povezana s slabšim izidom zdravljenja kot če je primarna Gleasonova ocena 3 (3 +4=7) (34).



Slika 6: Gleasonov sistem diferenciacije – standardna slika (32)

1. 3 DIAGNOZA KARCINOMA PROSTATE

V diagnozi karcinoma prostate se uporabljajo številne metode, katerih cilj je potrditi tumor in določiti njegovo razširjenost ter na osnovi teh rezultatov določiti primerno zdravljenje. V zgodnji diagnostiki se uporabljajo digitalni rektalni pregled (DRE), določanje serumske koncentracije PSA, transrektalni ultrazvok (TURP) in biopsija prostate. Kot prva izbira se največkrat uporablja kombinacija DRE in določanje koncentracije PSA v serumu (35).

1.3.1 DRE in določanje serumske koncentracije PSA

Kadar zaznamo povišano vrednost PSA ali opazimo nenormalnosti pri digitalnem rektalnem pregledu, sumimo na karcinom prostate (33). Za normalno vrednost koncentracije PSA je dolga leta štela vrednost 4 $\mu\text{g/l}$, v zadnjih letih pa se za zgornjo mejo šteje 3 $\mu\text{g/l}$ (35). Pri mlajših moških se ta meja spusti na manj kot 2-3 $\mu\text{g/l}$ (37). Razlog za

napačne rezultate so poleg nizke specifičnosti markerja, tudi druga bolezenska stanja. To so predvsem infarkt žleze, prostatitis, nepravilna presnova antigena in BHP (36). Vpliv na koncentracijo PSA pa ima tudi cistoskopija, ki lahko povzroči celo štirikratno povišanje koncentracije PSA v serumu (2). Prav tako lahko transrektalna biopsija prostate dvigne PSA za povprečno 7,9 µg /l, na vrednost pred biopsijo se vrne šele po 2 do 4 tednih (35). Ne glede na vrednost PSA je potrebno vsem z nenormalnim izvidom pri pregledu z DRE narediti biopsijo (35).

European Urological Association ne postavlja točno določene dobe za testiranje, ampak predvideva to kot dogovor med bolnikom in specialistom glede na prednosti in slabosti, ki jih zgodnje odkrivanje raka prinaša. Predlagana je izhodiščna določitev PSA pri 40 letih in glede na te rezultate se določi interval določevanja PSA. Pri osebah z začetno vrednostjo manjšo od 1 µg/l je priporočena določitev na 8 let, pri pacientih starejših od 75 let z vrednostjo PSA pod 3 µg/l pa nadaljnje določevanje ni potrebno, ker je majhna vrednost da bo le ta vplivala na prezgodnjo smrt (37).

Organizacija American Cancer Society pa je določila navodila za zgodnje odkrivanje raka prostate, in sicer letno presejanje z DRE in merjenje serumske koncentracije PSA pri moških nad 50 let, pri katerih pričakujemo, da bodo živeli še vsaj 10 let (33).

Pri postopku DRE je potrebno oceniti obliko prostate, velikost, konzistentnost, omejenost in bolečino, ki jo povzroča sam postopek (35). Z DRE ne moremo zaznati lezij manjših od 1,5 cm (38). Prav tako lahko z DRE odkrijemo le rak v periferni coni, raka v prehodni ali centralni coni pa z DRE ne moremo otipati (2). Če je pregled konzistentnosti v celoti negativen, še ne moremo izključiti tumorja. Lahko gre za tumor v prehodni coni, ki je nedostopen za DRE, ali pa gre za mali tumor v periferni coni, ki ga ne moremo zatipati (35). Dogovor med urologi je, da je DRE uporabna metoda le za detekcijo malignosti, ni pa natančna za določanje stopnje diferenciacije in razširjenosti tumorja (38). DRE ima nizko ponovljivost, poleg tega rabimo prostor za izvajanje DRE in izkušene preiskovalce, kar prinaša večje stroške (39). Le pri tretjini do polovici pacientov, ki so imeli pozitiven DRE, se na koncu z biopsijo potrdi rak prostate. Ta podatek govori o nizki specifičnosti metode in slabi pozitivni napovedni vrednosti (35). Z DRE odkrijemo 18 % rakov prostate pri moških z vrednostjo PSA 4 µg/l ali manj (40).

Če uporabimo DRE kot edino diagnostično metodo spregledamo 23-45 % karcinomov. Torej niti občutljivost DRE ne zadovoljuje potreb zgodnje diagnostike (35).

1.3.2 Transrektalni ultrazvok (TRUZ)

TRUZ se ne sme uporabljati kot samostojna metoda za detekcijo karcinoma prostate, ampak kot eden iz serije diagnostičnih testov (41). TRUZ pokaže spremenjena mesta in velikost žleze, poleg tega omogoča tudi voden odvzem tkiva žleze (2). Klasičen prikaz raka s TRUZ metodo je hipoehogeno področje okrogle ali ovalne oblike, včasih nepravilnega roba in različne velikosti z mogočo asimetrijo (35). Sama metoda ima nizko specifičnost pri določanju hipoehogenih predelov v periferni coni in izoehogenih rakov. To predstavlja velik problem, saj je vsaj 25 % klinično signifikantnih rakov izoehogenih in vsaj 40 % hipoehogenih predelov v periferni coni je malignih (41). Relevantnost ultrazvočnega izvida se spreminja s koncentracijo PSA v serumu. Torej verjetnost, da bomo zaznali rak prostate s TRUZ metodo je največja pri PSA 20 µg/l ali več. Večinoma se TRUZ uporablja v sklopu biopsije, ker omogoča natančnejši odvzem tkiva prostate (29).

1.3.3 Biopsijski vzorci

Pri sumu na karcinom prostate diagnozo navadno potrdimo s TRUZ vodeno biopsijo. Zaradi omejene občutljivosti pri vizualizaciji karcinoma prostate z ultrazvokom, nam ta večinoma služi le kot orodje za odvzem tkiva. Najbolj uporabljen način odvzema tkiva je t.i. sekstantni protokol, s katerim odvezamemo 6 vzorcev iz različnih delov prostate (33).

Igelna biopsija

Trenutna standardna metoda za detekcijo karcinoma prostate je s TRUZ vodena igelna biopsija. Običajno sledi nenormalnemu izvidu rektalne palpacije prostate, zvišanim vrednostim PSA v serumu ali patološkemu TRUZ izvidu. Direktne biopsije lezij najdenih preko DRE ali ultrazvoka morajo biti kombinirane s sistemsko biopsijo. To pomeni, da moramo odvzeti 6 ali več vzorcev, ki morajo zajemati vrh, sredino in bazo prostate, a vendar le periferni del prostate (42). Novejše raziskave kažejo, da biopsije z več kot šestimi vzorci odkrijejo do 35 % več primerov karcinoma prostate v primerjavi z največkrat uporabljenim sekstantnim protokolom (2).

Transuretralna resekcija (TURP)

Večina tumorjev odkritih s TURP je tistih v prehodni coni, če gre za velik tumor lahko tudi v periferni coni. Vzorec, ki ga odvezamemo s TURP metodo, ima lahko tudi več kot 100 g in je zato pogosto potrebno omejiti količino tkiva za histološki pregled (42).

Prostatektomija

Pregled kirurško odstranjene celotne prostate ni več namenjen začetni diagnostiki karcinoma, pač pa je nujno potreben za dokončno določitev stopnje razširjenosti tumorja in oceni kirurških robov. To pa je odločilnega pomena pri načrtovanju morebitnega nadaljnjega zdravljenja (2).

Aspiracijska biopsija

Uporabljala se je predvsem pred odkritjem s TRUZ vodene biopsije. Najpogostejša slabost je potencialen vir lažno pozitivnih rezultatov, ki so posledica vnetne atipije, prostatične intraepitelne neoplazije ali kontaminacije epitelijskih semenskih vrečk. Ker ima poleg tega tudi nekaj prednosti, se še vedno uporablja v nekaterih državah. Največje prednosti so poceni tehnologija, dejstvo, da gre za hitro metodo, navadno relativno nebolečo in z malo možnosti za zaplete (42).

1.4 TUMORSKI OZNAČEVALCI

Tumorski označevalci so produkti malignih celic ali snovi, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom delovanja malignih celic. Določamo jih v telesnih tekočinah, najpogosteje v serumu ali plazmi. Tumorski označevalci so lahko novo sintetizirane snovi, kakršnih v zdravem organizmu ne najdemo ali snovi, ki so v zdravem organizmu prisotne, vendar v veliko manjših koncentracijah. Določanje tumorskih označevalcev nam lahko pomaga pri diagnozi bolezni, napovedovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni, izbiri načina zdravljenja, zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni. Tumorski označevalci so zaradi svoje nizke specifičnosti za tkivo, organ, vrsto rakave bolezni in slabih napovednih lastnosti manj primerni za odkrivanje primarnih rakavih obolenj in jih le redko uporabljamo kot presejalno metodo. Vseh tumorskih označevalcev ne uporabljamo z istim namenom. Nekateri so primernejši za lažjo diagnostiko bolezni, drugi za zgodnje odkrivanje bolezni (43). Tumorski označevalci nam lahko služijo tudi kot napovedni dejavnik. Spremljanje maligne bolezni pred, med in po zdravljenju nam lahko pove veliko o naravi maligne bolezni in s tem o prognozi bolnika (44).

Določitev tumorskih označevalcev za postavitev diagnoze raka ne zadošča. Nujno je, da jo postavimo z odvzemom tumorskega tkiva (kirurška biopsija) ali tumorskih celic (aspiracijska biopsija) (45).

1.4.1 Specifičnost in občutljivost tumorskih označevalcev

Lastnosti idealnega tumorskega označevalca (43):

- Označevalec naj bi bil značilen za organ in tumor
- Označevalec naj bi tvorila samo maligna tumorska tkiva
- Označevalec naj bi bil dokazljiv pri vseh bolnikih z istovrstnim tumorjem
- Tvoril naj bi se v zadostnih količinah, ki bi jih lahko zaznali že na začetni stopnji razvoja malignega tumorja
- Serumske koncentracije naj bi odražale velikost tumorske mase

Vlogo in vrednost posameznega tumorskega označevalca ter metode za določeno vrsto rakave bolezni natančno opredelimo s pojmom specifičnost in občutljivost. Specifičnost predstavlja delež preiskovancev, ki nimajo rakavega obolenja in imajo normalno koncentracijo tumorskega označevalca. To pomeni, da je tumorski označevalec tem bolj specifičen, čim manj krat je prisoten pri ljudeh brez tumorja. Pri takem tumorskem označevalcu pričakujemo čim manj lažno pozitivnih določitev. Občutljivost tumorskega označevalca pove, pri kolikšnem deležu bolnikov z nekim tumorjem je raven označevalca povišana. Čim večji je delež bolnikov z istovrstnim tumorjem, pri katerih je delež tumorskega označevalca povišan, tem bolj občutljiv je označevalec. Pri takem tumorskem označevalcu pričakujemo majhno število lažno negativnih določitev. Idealen tumorskioznačevalec naj bi imel 100 odstotno občutljivost in referenčno vrednost 0 (44).

1.4.2 Delitev tumorskih označevalcev

Delitev po biokemičnih lastnostih, mestu nastanka in funkcionalnosti (43):

- Onkofetalni proteini
- Hormoni in/ali karcinoplacentarni proteini
- Encimi
- Tumor spremljajoči antigeni
- Posebni serumski proteini
- Mešani označevalci

Delitev glede na mesto določitev (43):

- Humoralni tumorski označevalci (kri, telesne tekočine) in
- Celični tumorski označevalci (v celicah ali na površini celic)

1.4.3 Prostatno specifični antigen

PSA (prostatno specifični antigen)

PSA je glikoprotein z molekulsko maso 35 kD. Sestavljen je iz preproste verige, ki vsebuje 273 aminokislin. Ima 4 stranske verige, ki jih tvorijo ogljikovi hidrati in več disulfidnih povezav med aminokislinami. Genski zapis za PSA je na 19. kromosomu, razpolovni čas antigena je 2,2 do 2,3 dni. Prvič so ga odkrili v semenski tekočini leta 1960. Wang je leta 1979 iz tkiva prostate izoliral tkivno specifično snov, ki jo je poimenoval prostatno specifični antigen. PSA je serinska proteaza, ki se v serumu nahaja v več molekularnih oblikah, ki so sestavljene tako iz prostega PSA kot kompleksnega PSA (46). Ponavadi je od 70 % do 90 % PSA v serumu kompleksnega ostali del pripada prostemu PSA (47).

Kompleksen PSA je v obtoku kovalentno vezan z inhibitorji proteinaz (alfa 1 antihimotripsin in alfa 2 makroglobulin) v veliki makromolekularni kompleks (35). PSA sintetizirajo epitelne celice duktusov in acinusov, kjer se tudi akumulira, le manjši del se izloča v semensko tekočino, kjer služi za njeno utekočinjenje (36). Do sredine osemdesetih let je bilo dokazano, da je merjenje koncentracije PSA uporabna metoda za opazovanje raka prostate po zdravljenju in je bila odobrena s strani Food and Drug Administration za uporabo v te namene. V začetku devetdesetih let so mnoge raziskave dokazale, da je PSA uporabno orodje tudi v testiranju za rak prostate in je bila posledično s strani Food and Drug Administration uporaba PSA odobrena tudi v te namene, z zgornjo mejo 4 µg/l (48). Presejalni pregledi res da omogočajo hitrejšo diagnozo, vendar detektirajo tudi rake, ki v nasprotnem primeru ne bi bili odkriti. Oba dejstva imata vpliv na skupne koristi presejalnih pregledov (36). Presejalni pregledi se pri nas in drugod po svetu ne izvajajo. S takim testiranjem bi bilo sicer možno odkriti več zgodnjih rakov, vendar pa bi hkrati povečali število moških, pri katerih bi brez potrebe zdravili sicer biološko neagresivne rake, torej rake ki bi verjetno do smrti ostali neaktivni oziroma ne bi bili razlog za smrt (45).

Prosti PSA

Z določevanjem proste oblike PSA ter s pravilnim vrednotenjem deleža prostega glede na celotni PSA lahko dokaj zanesljivo napovemo, ali gre v prostati za benigno ali za maligno spremembo (49). Predvsem se to izraža pri koncentracijah PSA med 2 in 10 µg/l, ki veljajo za diagnostično »sivo cono«. Pomanjkanje specifičnosti PSA v tem območju je klinično pomembno, saj ima približno 30 % bolnikov z rakom prostate, katerih vrednosti PSA so v tem območju, že lokalno napredovan rak ali celo metastaze v času dokončne patološke določitve (50). Kljub precej visoki občutljivosti, ki znaša med 79 % in 82 %, je specifičnost slabša in navadno ne presega 60 % (36). Zaradi tega je bilo narejenih več izpeljav PSA, ki imajo večjo napovedno vrednost.

Ena od teh izpeljav je določanje prostega in celotnega PSA. Če je razmerje prostega in celotnega PSA 0,2 ali manj, je velika verjetnost da gre za malignen proces, razmerje večje od 0,2 pa govori v prid benigne bolezni (49). Uporaba deleža prostega PSA signifikantno izboljša odkrivanje raka prostate pri moških s koncentracijo PSA od 4 do 10 µg/l, vendar se je pokazal za manj učinkovitega v razlikovanju med rakom prostate in BHP, če je koncentracija PSA manj kot 4 µg/l (24).

Gostota PSA glede na prostato (PSA density)

Gostota PSA je kvocient koncentracije PSA z volumnom prostate, ki jo določamo s TRUZ (51). Pomaga pri določanju potrebe po biopsiji prostate. Ker se več PSA izloča v obtok iz rakavih celic prostate, kot iz benignih epitelijskih celic prostate, imajo moški s povišano gostoto PSA večjo verjetnost za raka prostate (52). Prehodna cona prostate je primarno povezana z BHP, zato so mnoge raziskave preučevale možnost prilagajanja PSA volumnu prehodne cone namesto volumnu celotne prostate. Ta parameter je poimenovan gostota PSA glede na prehodno cono (PSADTZ) (48). Večina raziskav je dokazala prednost določevanja gostote PSA v primerjavi z določanjem serumske PSA, le redke študije so dokazale prednost v primerjavi z določanjem deleža prostega PSA. Večina teh raziskav je vključevala relativno malo pacientov (53).

V eni izmed raziskav so dokazali, da pri pacientih z vmesno vrednostjo PSA (t.i. diagnostična »siva cona«), PSADTZ boljše predvidi pozitivno biopsijo kot konvencionalni PSAD (54). PSAD je najbolj učinkovit, ko se uporablja skupaj z ostalimi dejavniki z namenom določanja tveganja in možnosti zdravljenja. Ovira pri določevanju PSAD je predvsem dejstvo, da je potrebno uporabiti TRUZ, ki pa se večinoma ne uporablja kot

ločen postopek pred biopsijo. Prav tako so omejitve zaradi točnosti in razlik v merjenju velikosti prostate (48).

Kinetika PSA (PSA velocity=PSAV, PSA velocity doubling-time=PSAVDT)

Oba parametra predstavljata spremembe v koncentraciji PSA skozi čas.

PSAV je definiran kot sprememba koncentracije PSA v določenem časovnem obdobju (npr. v enem letu). Metoda je bila razvita, da bi izboljšala specifičnost PSA (55).

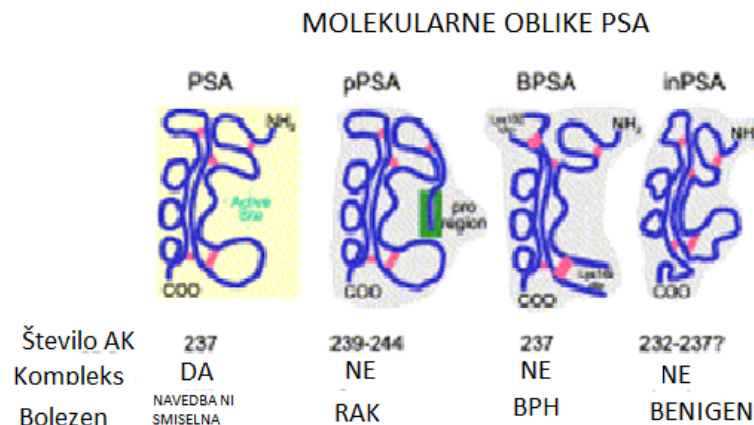
PSAVDT je definiran kot čas, ki je potreben, da se serumska koncentracija PSA podvoji (48).

PSAV se je izkazal za dober parameter pri ločevanju med pacienti z in tistimi brez raka prostate. Prav tako se je izkazal kot dober napovedovalec ponovnega izbruha bolezni pri pacientih z lokaliziranim rakom prostate po radikalni prostatektomiji ali radioterapiji (56). Krajši je PSAVDT, večja je verjetnost raka in večja je verjetnost, da gre za bolj agresivno obliko raka prostate. Postoperativni PSAVDT manj kot 3 leta kaže, da gre za ogroženo skupino bolnikov z manjšo možnostjo preživetja (2).

1.4.4 Prostatno specifični proantigen

Pred kratkim so ovrednotili različne molekularne oblike prostega PSA in ugotovili so, da so le te različno povezane z BHP in rakom prostate (slika 7). Gre za encimsko neaktivne prekurzorske oblike in sicer (57):

- izoforme proPSA, ki so povečane v rakavem tkivu in serumu
- benigna oblika PSA (BPSA) in
- intaktna PSA, ki je povezana z BHP.



Slika 7: Molekularne oblike PSA (57)

ProPSA je oblika prostega PSA. Gre za proencim PSA (57). ProPSA je prekurzor in ima 7 dodatnih aminokislin glede na končni PSA. V serumu najdemo še oblike s pet, štiri in dvema dodatnimi aminokislinami (58). Humani kalikrein 2 in tripsin cepita izoforme proPSA do aktivnega PSA (59). Cepitev dodatnih aminokislin povzroči aktivacijo PSA, vendar sposobnost cepitve s kalikreinom ali tripsinom upada s krajšanjem aminokislinskega zaporedja. Končna oblika med izoformami je [-2]proPSA in le ta je odporna na aktivacijo, torej je omenjeni encimi več ne morejo cepiti (58).

V serumu osebe brez raka najdemo približno 10 % proste oblike PSA, od tega je le 6 % do 19 % prostatno specifičnega proantigena z dvema dodatnima aminokislinama ([-2]proPSA). V nasprotju s tem pa predstavlja [-2]proPSA 25-95 % prostega PSA pri pacientih z rakom prostate (58).

V eni od raziskav so dokazali, da je povišana vrednost proPSA v serumu pri raku prostate povezana predvsem s prekurzorji, ki vsebujejo 2 ali 4 dodatne aminokislino, torej obliki [-2]proPSA in [-4]proPSA (24). Spet v drugi študiji so dokazali, da je tudi oblika [-7]proPSA povezana s povišano vrednostjo proPSA pri raku prostate (34). Ker je [-2]proPSA koncentriran v rakavem tkivu, v primerjavi z ostalimi izoformami kaže nadpovprečno točnost v detekciji raka prostate (57). [-2]proPSA je med vsemi izoformami najbolj pogosta oblika v tumorskem ekstraktu, poleg tega se pri imunohistokemičnem dokazovanju tumorske celice vežejo bolj močno kot benigne (60). Večina raziskav opredeljuje klinično uporabnost proPSA, kot seštevek vseh prekurzorskih oblik proPSA ([-2]proPSA, [-4]proPSA, [-5]proPSA in [-7]proPSA) ali le kot [-2]proPSA. Spet druge opredeljujejo uporabnost proPSA v razmerju s prostim PSA, torej [-2]proPSA/prosti PSA

ali enostavno kot proPSA/prosti PSA (proPSA je tukaj spet seštevek vseh 4 prekursorških oblik) (24, 47, 60).

V eni izmed raziskav je [-2]proPSA pokazal večjo verjetnost za ločevanje med bolnimi in zdravimi kot PSA in delež prostega PSA (60). To so dokazali z izračunom AUC. Vrednost AUC za obliko [-2]proPSA je bila enaka 0,63, medtem ko je bila vrednost AUC za PSA enaka 0,52 in AUC za delež prostega PSA enak 0,61 (60). Dejstvo, da z uporabo tumorskega označevalca [-2]proPSA bolje ločujemo med bolnimi in zdravimi kot z uporabo tumorskega označevalca PSA in z uporabo deleža prostega PSA, so potrdili v še eni raziskavi. Razlika z zgoraj omenjeno raziskavo je bila le, da so AUC določevali tumorskemu označevalcu [-2]proPSA v razmerju s koncentracijo prostega PSA. Določili so torej vrednost AUC za kvocient [-2]proPSA/PSA, ki je znašala 0,645 in je presegla tako vrednost AUC za delež prostega PSA, ki je znašala 0,59 in vrednost AUC tumorskega označevalca PSA, ki je znašala 0,555 (37).

Merjenje proPSA v t.i. diagnostični »sivi coni«, ki jo opredeljuje koncentracija PSA med 2 in 10 µg/l so izvedli v eni izmed raziskav (24). Dokazali so, da je delež proPSA v tem območju izkazoval največjo specifičnost pri dokazovanju raka prostate. Koncentracijsko območje so v tej raziskavi razdelili na dva dela: na skupino pacientov s PSA med 2 in 4 µg/l in na skupino pacientov s PSA med 4 in 10 µg/l. V koncentracijskem območju od 2 do 4 µg/l PSA in pri 90 % občutljivosti se je z določevanjem deleža proPSA zmanjšal delež nepotrebnih biopsij za 19 %, pri skupini pacientov, katerim so določevali delež prostega PSA pa so določili le 10 % zmanjšanje nepotrebnih biopsij. V koncentracijskem območju PSA od 4 do 10 µg/l in pri isti občutljivosti je določanje deleža proPSA zmanjšalo delež nepotrebnih biopsij za 31 %. V koncentracijskem območju od 2 do 10 µg/l se je torej z določevanjem deleža proPSA zmanjšal delež nepotrebnih biopsij za 21 %. Specifičnost za detekcijo raka in zmanjšanje nepotrebnih biopsij se je signifikantno izboljšalo predvsem v koncentracijskem območju od 2 µg/l do 4 µg/l PSA, kjer je bil $p < 0,001$ za razliko od ostalih območij, kjer je bil $p < 0,0001$ (24). Te rezultate je potrdila še ena raziskava, ki je določila isti delež zmanjšanja nepotrebnih biopsij (19 % in 31 %) in v istih PSA koncentracijskih območjih ter z isto občutljivostjo (90 %). Poleg tega so ugotovili, da je delež proPSA uporaben označevalec za določanje agresivnosti tumorja. Delež proPSA je bil signifikantno večji pri pacientih, katerim so na osnovi z biopsijo odvzetih vzorcev določili stopnjo diferenciacije Gleason 7 ali več, kot pri tistih, katerim so

določili Gleasonovo oceno 7 ali manj. Ta razlika ni bila signifikantna niti pri določevanju tumorskega označevalca PSA niti pri deležu prostega PSA (34).

[-2]proPSA oblika je imela podobno klinično vrednost kot delež prostega PSA v večini primerov, vendar se je izkazala za edinstven tumorski označevalec v raziskavi, kjer so imeli pacienti delež prostega PSA večjega od 25 %. Prav tako se je pokazalo, da ima proPSA večjo klinično vrednost v koncentracijskem območju PSA od 4 do 10 µg/l, medtem ko ima [-2]proPSA večjo klinično vrednost v koncentracijskem območju od 2 do 4 µg/l (47).

1.4.5 phi (Prostate Health Index)

Ena od novejših možnosti, ki združuje celokupno koncentracijo PSA v serumu, koncentracijo prostega PSA in koncentracijo [-2]proPSA je parameter imenovan phi (Prostate Health Index). Razvit je bil s strani podjetja Beckman Coulter Inc (Brea, CA, USA) (59). Matematična formula za izračun phi je prikazana v enačbi 1.

$$\text{phi} = \frac{[-2]\text{proPSA}}{\text{prosti PSA}} \times \sqrt{\text{PSA}} \quad \text{Enačba 1}$$

Določevanje phi je v Evropi odobreno vse od leta 2010, v ZDA pa so ga odobrili pred kratkim in sicer junija 2012 (61).

V prvi prospektivni raziskavi leta 2011 so vključili moške s koncentracijo PSA med 2,5 µg/l in 10 µg/l in normalnim DRE. 41 % moških je bilo diagnosticiranih z rakom prostate in vsi so imeli Gleasonovo oceno 6 ali 7. Ko so primerjali koncentracijo PSA med osebami, katerim so z biopsijo dokazali prisotnost raka in tistimi, katerim raka niso dokazali, v serumski vrednosti PSA ni bilo nobene signifikantne razlike. Razlika je bila signifikantna pri primerjavi deleža [-2]proPSA med osebami s pozitivno in negativno biopsijo. Delež [-2]proPSA in phi sta pokazala skoraj enako verjetnost za ločevanje med osebami z rakom in osebami brez raka. To sklepamo iz izračunanih AUC, in sicer vrednost AUC za delež [-2]proPSA je znašala 0,76 in vrednost AUC za phi je znašala 0,77.

Pomembno je poudariti, da sta bila tako delež [-2]proPSA in phi v ločevanju med zdravimi in bolnimi signifikantno boljša tako od določevanja koncentracije PSA in določevanja deleža prostega PSA. Regresijska analiza je pokazala, da bi s kombinacijo deleža prostega PSA in deleža [-2]proPSA zagotovili boljše razlikovanje med BHP in rakom prostate. Iz

tega so sklepali, da bi bil phi uporaben za bolj natančno napoved pozitivnega izida biopsije (57). To je bilo potrjeno s strani še ene študije, ki je podprla trditev, da se z uporabo phi zmanjša število nepotrebnih biopsij (62).

Po kliničnih podatkih, ki jih je podjetje Beckman Coulter predalo Food and Drug Administration lahko z uporabo phi preprečimo eno od 7 biopsij in pri tem še vedno odkrijemo 95 % primerov raka prostate. Medtem z določevanjem koncentracije PSA preprečimo le eno od desetih nepotrebnih biopsij (61).

Phi ima tudi večjo specifičnost od deleža prostega PSA ne glede na določeno občutljivost. Večja kot je vrednost phi, večja je verjetnost za rak prostate (preglednica I) (69).

Pomembno dejstvo je, da je bila ta povezava med phi in večjo verjetnostjo za rak prostate stalna v vseh starostnih obdobjih pacientov, pri vseh koncentracijah PSA in za paciente, ki so pripadali različnim etničnim skupinam. Zato se ponuja možnost uporabe phi kot parametra za spremljanje vsakega pacienta (62).

Preglednica I: Verjetnost za rak prostate kot predvideva phi (63)

phi razpon	0 – 24,9	25,0 – 34,9	35,0 – 54,9	55 +
Verjetnost za rak prostate (5 % interval zaupanja) (%)	11,0	18,1	32,7	52,1
Relativno povečanje tveganja za rak prostate (5 % interval zaupanja) (%)	1,0	1,6	3,0	4,7
Delež pacientov diagnosticiranih z rakom prostate v različnih območjih phi vrednosti (%)	24,9	32,8	29,5	12,8

2 NAMEN DELA

Karcinom prostate je vse bolj pogosta bolezen sodobnega časa, ki velikokrat predolgo ostane brez vidnih kliničnih znakov. Še vedno najbolj uporabljan tumorski označevalec je PSA in njegova prosta frakcija. Tumorski označevalec PSA ima zelo nizko specifičnost in majhno diagnostično oziroma klinično uporabnost v zgodnji diagnostiki oziroma ko je koncentracija PSA še v območju diagnostične »sive cone«. Iz tega razloga bomo v diplomski nalogi ovrednotili tumorski označevalec [-2]proPSA, ki je med vsemi prekursorskimi oblikami proPSA do danes pokazal največjo vrednost pri odkrivanju karcinoma prostate, in njegovo izpeljanko phi. Oba predstavljata novi možnosti za zgodnjo diagnostiko, uspešnejše in hitrejšje zdravljenje ter okrevanje pacientov.

Meritve, katere bomo uporabili pri statistični analizi, so bile izvedene v UKC Ljubljana. V te meritve spada tako serumska analiza vzorcev kot histološka analiza tkiva, na osnovi katere smo bolnike razdelili v skupino bolnikov s karcinomom prostate in na skupino, v katero spadajo vsi ostali bolniki z nemalignimi spremembami prostate.

Namen diplomskega dela je:

- Izračun in primerjava specifičnosti in občutljivosti tumorskega označevalca [-2]proPSA s tumorskim označevalcem PSA in deležem prostega PSA
- Izračun phi
- Izračun in primerjava specifičnosti in občutljivosti phi s tumorskim označevalcem PSA in deležem prostega PSA
- Določanje diagnostične uporabnosti tumorskega označevalca [-2]proPSA
- Določanje diagnostične uporabnosti parametra phi

3 MATERIALI IN METODE

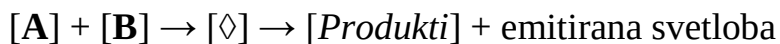
3.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PSA, PROSTEGA PSA IN [-2]proPSA

Koncentracije vseh 3 tumorskih označevalcev so bile določene z Beckman Coulter Access 2 Immunoassay sistemom. Gre za in vitro diagnostično napravo namenjeno kvantitativnemu, semikvantitativnemu ali kvalitativnemu določanju različnih analitov, katere najdemo v človeških tekočinah. Pomembno je, da merjenje vseh 3 parametrov opravimo z istim sistemom in z materiali istega proizvajalca za najbolj realne in primerljive rezultate.

3.1.1 Princip metode

Access 2 testi so dvostranski imunoencimski (t.i. »sandwich«) testi. Za vse 3 označevalce je postopek enak, največja razlika je le v tem, da je alkalna fosfataza v konjugatu ali s PSA ali prostim PSA ali [-2]proPSA, odvisno od označevalca katerega določujemo (65).

Vzorec dodamo v reakcijsko posodo, ki že vsebuje konjugat mišjega anti **PSA / prosti PSA / [-2]proPSA** in alkalne fosfataze in paramagnetne delce obdane z drugim mišjim monoklonskim anti PSA protitelesom. PSA / prosti PSA / [-2]proPSA v vzorcu se veže na monoklonski anti PSA, ob istem času pa konjugat reagira z drugo antigensko stranjo PSA / prostega PSA / [-2]proPSA. Nato vse skupaj inkubiramo, snovi vezane na trdo fazo ostanejo v magnetnem polju, ostalo pa izperemo. Nato dodamo kemiluminiscentni substrat Lumi-Phos* 530, ki reagira z alkalno fosfatazo vezano v konjugatu. Pri tem pride do emisije svetlobe, katero merimo z luminometrom. Reakcija, ki poteče je prikazana v enačbi 2. Sistem emitirano svetlobo nato pretvori v rezultat (65).



Enačba 2

Emitirana svetloba je direktno proporcionalna koncentraciji PSA / prostega PSA / [-2]proPSA. Iz dobljenih koncentracij potem izračunamo phi.

3.1.2 Materiali

- **Reagent Access Hybritech**, ki glede na označevalec katerega določamo vsebuje PSA / prosti PSA / [-2]proPSA.

- **Kalibrator Access Hybritech:** kalibriramo pri 6 oziroma 7 različnih točkah.
- **Raztopine potrebne za izvedbo kontrole kakovosti**
- **Access Hybritech substrat:** LumiPhos*530 (puferna raztopina, ki vsebuje dioksan, Lumigen * PPD in surfaktant).
- **Pufer za izpiranje** sestavljen iz TRIS puferne raztopine, < 0,1% natrijevega azida, 0,5% ProClin** 300.
- **Vehikel za razredčitev vzorca** iz puferne raztopine govejega serumskega albumina, < 0,1% natrijevega azida, 0,5% ProClin** 300. Uporablja se samo pri določevanju PSA, ker koncentracije le tega v serumu velikokrat prekoračijo mejo S5 Access Hybritech PSA kalibratorja.
- centrifuga
- rokavice iz lateksa
- pipete in nastavki za pipete

3.1.3 Postopek testiranja

Naprava s katero delamo, nam omogoča skoraj popolno avtomatizacijo postopka. Pred začetkom preskusa je potrebno le pripraviti vzorce in jih namestiti v stojalo. Ostali reagenti so že pripravljeni za uporabo. Inštrument ima 6 stojal in vsako od teh lahko drži 10 vzorcev (65).

1. V epruveto za vzorec odpipetiramo 25 μ L vzorca za določevanje PSA in prostega PSA ter 50 μ L vzorca za določevanje [-2]proPSA. Takšna količina vzorca je namenjena enkratnemu testiranju, brez upoštevanja nefunkcionalnega volumna epruvete. V primeru večkratnega testiranja moramo količine pomnožiti. Prav tako je potrebno upoštevati nefunkcionalen volumen epruvete, ki je odvisen od tipa epruvete. Upoštevati moramo izračun iz slike 8.

$$\begin{array}{|c|} \hline \text{VOLUMEN 1} \\ \text{VZORCA} \\ \text{POTREBNEGA} \\ \text{ZA ANALIZO} \\ \hline \end{array} \times \begin{array}{|c|} \hline \text{ŠTEVILO} \\ \text{PONOVI TEV} \\ \text{ANALIZ} \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline \text{NEFUNKCIO} \\ \text{NALEN} \\ \text{VOLUMEN} \\ \text{EPRUVETE} \\ \hline \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline \text{SKUPNI} \\ \text{VOLUMEN} \\ \text{VZORCA} \\ \hline \end{array}$$

Slika 8: Izračun volumna vzorca potrebnega za analizo

2. Pregledati je potrebno stanje količine reagenta, substrata in pufru za izpiranje. Pred nalaganjem novih vsebnikov z reagentom le te nežno premešamo preden jih postavimo v inštrument.
3. Nato izberemo analizo, s tem da izbiramo med ponujenimi možnostmi na ekranu, torej testiranje PSA, prostega PSA in [-2]proPSA.
4. Inštrument avtomatsko izračuna končne rezultate. Če je rezultat višji od 20 µg/l za prosti PSA in 150 µg/l za PSA, vzorec redčimo in ponovno analiziramo. Pri rezultatih nižjih od 0,1 µg/l analizo ponovimo.
5. Na koncu odstranimo vzorce in kontrole. Kontrole vrnemo v hladilnik, vzorce pa ponovno zamrznemo (64).

3.1.4 Izračun rezultatov

Rezultati se določajo avtomatsko s pomočjo programske opreme. Iz zmerjene emisije svetlobe (RLU) se določi koncentracija analita s pomočjo shranjene nelinearne umeritvene krivulje (65).

3.2 STATISTIČNE METODE

Statistično smo meritve obdelali s pomočjo statističnega programa SPSS.

3.2.1 Mere variabilnosti

Pri vseh meritvah smo najprej izrisali kvartilni diagram z namenom pregleda nad razpršenostjo naših meritev in predvsem z namenom določevanja vrednosti, ki preveč odstopajo od ostalih meritev – izstopajoče vrednosti ali osamelci. Te meritve bi preveč vplivale na srednje vrednosti, predvsem na aritmetično sredino in bi tako popačile realno sliko.

3.2.1.1 Kvartilni diagram

Kvartilni diagram je neparametrična mera za razpršenost oziroma variiranje podatkov. Kvartilni diagram opredeljuje več vrst razmikov in sicer centile, decile in kvartile. Kvartili so 3 in razdelijo podatke na 4 enake dele. Prvi kvartil (Q1) obsega 25 % vseh podatkov z najnižjimi vrednostmi, tretji kvartil (Q3) pa 75 % vseh podatkov z najnižjimi vrednostmi oziroma 25 % vseh podatkov z najvišjimi vrednostmi. Drugi kvartil je obenem tudi mediana (slika 9) (67).

Kvartilni diagram nam opredeli tudi osamelce ali izstopajoče vrednosti. Osamelec je vrednost spremenljivke, ki je zunaj intervala (67):

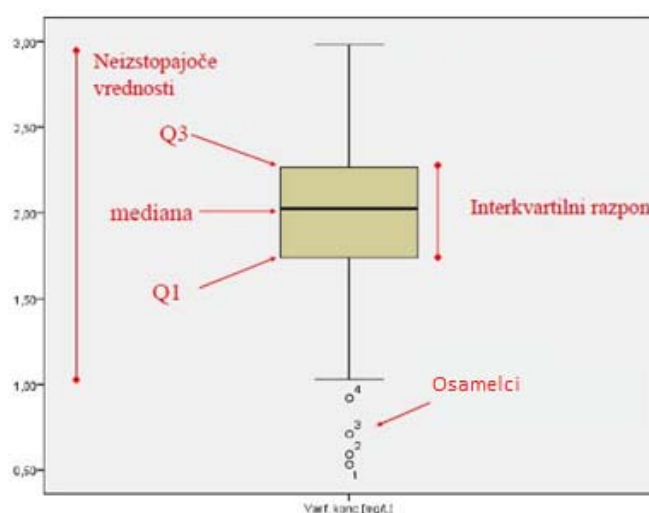
$$X < XQ1 - 1.50 \times (XQ3 - XQ1)$$

Enačba 3

$$X > XQ3 + 1.50 \times (XQ3 - XQ1)$$

Enačba 4

Te vrednosti se bistveno razlikujejo od ostalih vrednosti in utegnejo vplivati na pristranost podatkov.

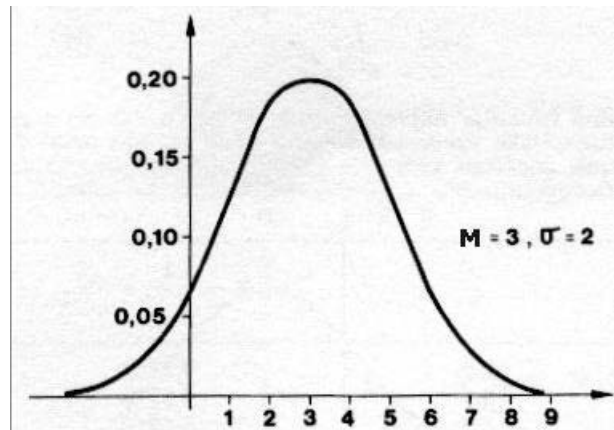


Slika 9: Prikaz kvartilnega diagrama z označemi kvartili in osamelci (67).

3.2.2 Testiranje normalnosti porazdelitve

Normalna porazdelitev je verjetnostna porazdelitev vrednosti statističnih enot v statistični populaciji. V grafični predstavitvi je oblikovana v obliki zvona oziroma normalne krivulje. Imenujemo jo tudi Gaussova porazdelitev, krivuljo pa Gaussova krivulja (slika 10) (68). Testiranje porazdelitve je temeljnega pomena za nadaljnjo obdelavo podatkov, saj je večina testov razdeljenih na osnovi tega, kako se podatki porazdeljujejo. Če uporabimo test, ki je namenjen za obdelavo normalno porazdeljenih podatkov, naša populacija pa je porazdeljena nenormalno, bodo rezultati neveljavni in celo zavajajoči. Normalnost porazdelitve lahko preverimo na več načinov (68):

- Temeljen grafičen način je izris histograma, ki je v veliko pomoč, če že na pogled odstopa od normalne porazdelitve. V tem primeru nadaljnja testiranja niti niso potrebna.
- Med najbolj znanimi statističnimi testi pa je Shapiro-Wilkov test in Kolmogorov-Smirnov test, čeprav obstaja še veliko drugih. Točno določenega izberemo na podlagi različnih meril (velikost vzorca, število podatkov..).



Slika 10: Prikaz grafa normalne porazdelitve (M =aritmetična sredina, σ =standardni odklon) (68)

3.2.2.1 Shapiro-Wilkov test

S Shapiro-Wilkovim testom, ki je eden od mnogih testov za določevanje oziroma preverjanje normalnosti porazdelitve, testiramo predvsem skupine oziroma populacije z manj kot 50 meritvami (69). Test deluje na način, da testira korelacijo med normalno porazdeljenimi podatki in našimi podatki. Pri izvedbi Shapiro-Wilkovega testa dobimo v rezultatih p vrednost, ki jo potem primerjamo z alfa vrednostjo (stopnja tveganja), katero definiramo na začetku. Navadno je stopnja tveganja 5 % (69).

Shapiro-Wilkov test izvedemo na način, da postavimo ničelno in alternativno hipotezo (69):

H_0 : Ni razlike med porazdelitvijo podatkov v naši populaciji in populaciji z normalno porazdeljenimi podatki

H_1 : Obstaja razlika med porazdelitvijo podatkov v naši populaciji in populaciji z normalno porazdeljenimi podatki.

Če je p večji od izbrane α vrednosti, ničelno hipotezo sprejmemo in lahko rečemo, da ni razlike med našo populacijo in normalno porazdeljenimi podatki, torej da gre za normalno porazdeljen vzorec (69).

3.2.3 Neparametrični testi za ugotavljanje razlik med dvema povprečnima vrednostima za neodvisne vzorce

V ta namen uporabljamo dva različna testa, Mann-Whitneyev test in Wilcoxonov test vsote rangov. Testa sta primerna za ločevanje med dvema povprečnima vrednostima za dva neodvisna vzorca, kjer so podatki nenormalno porazdeljeni. Teste, ki so namenjeni obdelavi nenormalno porazdeljenih podatkov, imenujemo neparametrični testi. Zgoraj omenjena testa sta neparametrična ekvivalenta parametričnemu t testu za odvisne vzorce (70).

3.2.3.1 Mann-Whitneyev U test in Wilcoxonov test vsote rangov

Mann-Whitneyev U test temelji na testni statistiki U , opredeljeni za skupino i z (68):

$$U_i = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2} - R_i \quad \text{Enačba 5}$$

kjer je R_i vsota rangov skupine i , n_1 in n_2 pa število meritev v posamezni skupini.

Za izpeljavo tega testa mora imeti vsaka meritev definirani dve spremenljivki, neodvisno oziroma kategorično in odvisno oziroma kvantitativno. Kategorična spremenljivka razdeli podatke v dve skupini oziroma dva ranga ne glede na skupino h kateri pripadajo meritve (71). Test temelji na predpostavki, da se povprečna ranga enega ali drugega vzorca razlikujeta samo v mejah slučajnosti, če podatke obeh uredimo v skupno ranžirno vrsto (66). Izvedemo ga tako, da vsak podatek X_i iz prve skupine primerjamo z vsakim podatkom Y_i iz skupine 2. Skupno število vseh primerjav, ki jih lahko naredimo je $N_x \times N_y$ (71).

Postavimo dve hipotezi:

$H_0: P(X_i > Y_i) = \frac{1}{2}$; verjetnost, da meritev iz skupine X preseže meritev iz skupine Y , je enaka verjetnosti, da meritev iz skupine Y preseže meritev iz skupine X

$H_1: P(X_i > Y_i) \neq \frac{1}{2}$; verjetnost, da meritev iz skupine X preseže meritev iz skupine Y ni enaka 0,5.

Pri uporabi programa SPSS nam le ta najprej opredeli range, in sicer vsoto rangov in povprečno vrednost ranga. Naprej poskušamo ugotoviti ali se povprečna ranga med seboj statistično značilno razlikujeta. V rezultatih dobimo Mann-Whitney U vrednost in vrednost Wilcoxonove vsote rangov W_s (72).

Vrednost statistike W_s je statistično značilna pri $p < 0,05$, če je njena absolutna standardizirana vrednost z večja od 1,96 (72).

$$Z = \frac{W_s - W_s'}{SE_{W_s}} \quad \text{Enačba 6}$$

kjer je W_s' povprečna vrednost testne statistike in SE_{W_s} njena standardna napaka. Njuni vrednosti izračunamo z (72):

$$W_s' = \frac{n_1 (n_1 + n_2 + 1)}{2} \quad \text{Enačba 7}$$

$$SE_{W_s} = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}} \quad \text{Enačba 8}$$

kjer sta n_1 in n_2 število meritev v vsaki skupini.

3.2.4 Določanje referenčnega intervala

Referenčni interval je interval, v katerem je 95 % vseh vrednosti, ostalih 5 % vrednosti pa se porazdeli pod mejo spodnjega referenčnega intervala in nad mejo zgornjega referenčnega intervala. Za določanje referenčnega intervala se največ uporabljata dve metodi. Ločita se na osnovi tega ali imamo normalno porazdeljene podatke ali logaritemsko normalno porazdeljene podatke (73).

Podatki v skupini, iz katere določujemo referenčni interval, so porazdeljeni normalno, zato za izračun referenčnega intervala uporabimo enačbo 4 in enačbo 5 (73).

$$\text{Spodnja meja} = m - t(0,975, n-1) \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times SD$$

Enačba 9

$$\text{Zgornja meja} = m + t(0,975, n-1) \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times SD$$

Enačba 10

kjer je:

m = povprečna vrednost meritev

n = število meritev

SD = standardni odklon meritev od povprečne vrednosti

t = 97,5 % kvantil Studentove t porazdelitve pri stopinjah prostosti $n-1$. Če imamo velik vzorec ($n > 30$) je $t(0,975, n-1)$ približno neka 2 (73).

3.2.5 Specifičnost in občutljivost

Specifičnost in občutljivost sta statistična parametra, s katerima opredeljujemo/ocenjujemo uspešnost testa v ločevanju/klasifikaciji med dvema faktorjema.

Diagnostična občutljivost (imenovana tudi delež resnično pozitivnih rezultatov) meri delež pozitivnih, ki so bili tako tudi diagnosticirani/opredeljeni. Ali povedano drugače, gre za verjetnost pozitivnega testa pri osebah pri katerih je bolezen prisotna (72).

Diagnostična specifičnost (imenovana tudi delež resnično negativnih rezultatov) meri delež negativnih, ki so bili tako tudi diagnosticirani/opredeljeni. Ali povedano drugače, gre za verjetnost negativnega izida testa pri osebah, ki nimajo bolezni (72).

$$\text{Diagnostična občutljivost} = \frac{RP \times 100}{RP + LN}$$

Enačba 11

$$\text{Diagnostična specifičnost} = \frac{RN \times 100}{RN + LP}$$

Enačba 12

kjer je RP definirana kot število resnično pozitivnih rezultatov, LN kot število lažno negativnih rezultatov, RN kot število resnično negativnih rezultatov in LP kot število lažno pozitivnih rezultatov (72).

Pomembno je poudariti, da niti specifičnost niti občutljivost nista pogojeni s prevalenco bolezni v določeni populaciji (72).

Za boljše ovrednotenje metode določujemo tudi pozitivno in negativno napovedno vrednost testa.

Pozitivna napovedna vrednost je verjetnost, da ima oseba bolezen, če je diagnostični test pozitiven (72).

Negativna napovedna vrednost je verjetnost, da oseba nima bolezni, če je diagnostičen test negativen (72).

$$\text{Pozitivna napovedna vrednost} = \frac{RP}{RP+LP} \quad \text{Enačba 13}$$

$$\text{Negativna napovedna vrednost} = \frac{RN}{RN+LN} \quad \text{Enačba 14}$$

Tako občutljivost in specifičnost kot pozitivno in negativno napovedno vrednost testa najlažje izračunamo, če si pripravimo standardno kontingenčno tabelo (slika 11).

Kontingenčna tabela je večrazsežna tabela dveh opisnih spremenljivk. Ta tabela nam omogoča, da na osnovi izračunane/definirane referenčne vrednosti, meritve opredelimo kot pozitivne vrednosti ali negativne vrednosti. To velja, če predhodno z drugo metodo opredelimo, katere meritve spadajo v določeno kategorijo (73).

NAPOVEDANI RAZRED	PRAVI RAZRED	
	RESNIČNO POZITIVNI REZULTATI	LAŽNO POZITIVNI REZULTATI
LAŽNO NEGATIVNI REZULTATI		
RESNIČNO NEGATIVNI REZULTATI		

Slika 11: Primer kontingenčne tabele

V primeru diplomske naloge smo z biospijo vzorcev prostate paciente uvrstili v skupino bolnikov s karcinomom in v skupino bolnikov brez karcinoma (lahko pa s katero drugo nemaligno boleznijo). Na osnovi izračunane referenčne vrednosti smo meritve potem opredelili v skupino resnično/lažno pozitivnih vrednosti in v skupino resnično/lažno negativnih vrednosti.

3.2.6 ROC krivulja in AUC

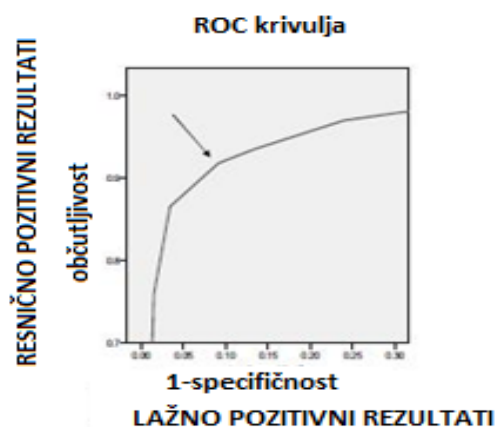
3.2.6.1 ROC krivulja

ROC krivulja je grafična predstavitev razmerja resnično pozitivnih rezultatov (občutljivost) na y osi in lažno pozitivnih rezultatov (1- specifičnost) na x osi pri različnih

referenčnih vrednostih (slika 12). ROC krivulja ima številne prednosti v primerjavi s posameznimi vrednostmi za specifičnost in občutljivost pri določeni referenčni vrednosti, in sicer (73):

1. ROC krivulja prikaže vse možne mejne vrednosti, optimalno referenčno vrednost za ločevanje med osebami z boleznijo in osebami brez bolezni lahko nato izberemo sami.
2. ROC krivulja je neodvisna od prevalence določene bolezni v populaciji, ker temelji na specifičnosti in občutljivosti, na kateri prevalenca nima vpliv.
3. Vizualno lahko primerjamo dva ali več testov.
4. Včasih je občutljivost bolj pomembna od specifičnosti in obratno. ROC krivulja nam omogoča, da najdemo zahtevano vrednost občutljivosti pri točno določeni specifičnosti.

ROC krivuljo izrišemo na osnovi specifičnosti in občutljivosti, katere definiramo pri različnih referenčnih vrednostih.



Slika 12: Primer ROC krivulje (73)

3.2.6.2 AUC

AUC ali površina pod ROC krivuljo nam pove verjetnost, da bo naš tumorski označevalec ločil osebe z boleznijo in osebe brez bolezni, je torej mera za kvaliteto diagnostičnega testa. Dober diagnostični test bo rezultiral v ROC krivulji, ki se hitro dviga v zgornji levi kot (71).

Večja kot je površina pod krivuljo, boljša bo celokupna uspešnost testa v ločevanju med bolnimi in zdravimi osebami. Enaki površini pod krivuljo za dva različna testa nam povesta, da imata testa podobno uspešnost v ločevanju, vendar to nujno ne pomeni, da bosta krivulji enaki. Takšni krivulji se lahko tudi sekata (71).

Definiramo lahko 3 pogoste načine interpretacije površine pod krivuljo (72):

1. Povprečna vrednost občutljivosti za vse možne vrednosti specifičnosti.
2. Povprečna vrednost specifičnosti za vse možne vrednosti občutljivosti.
3. Verjetnost, da bo slučajno izbran bolnik z boleznijo imel pozitiven rezultat testa, ki označuje večji sum na bolezen kot slučajno izbrana oseba brez bolezni.

Določevanje AUC je zelo podobno Mann-Whitneyevemu U testu. Gre za verjetnost, da bo tumorski označevalec pripisal višji rang naključno izbranemu bolniku z rakom kot naključno izbrani osebi.

Pri izračunu upoštevamo formulo (72):

$$AUC = \frac{U}{n_1 n_2} \quad \text{Enačba 15}$$

kjer je U, vrednost Mann-Whitneyeve U testne statistike, n_1 in n_2 pa sta število meritev v posamezni skupini.

3.2.7 Metoda za določitev moči povezave med spremenljivkami

Za določitev moči povezave med spremenljivkami smo uporabili Spearmanov koeficient korelacije, ker so spremenljivke uporabljene v diplomski nalogi nenormalno porazdeljene. Spearmanov koeficient je neparametrična alternativa Pearsonovemu korelacijskemu koeficientu. Z njim ugotavljamo ali sta spremenljivki povezani. Med spremenljivkami gre lahko za negativno ali pozitivno korelacijo, saj se vrednosti izračunanega r lahko gibljejo med -1 in +1. Negativna korelacija nam pove, da se ena spremenljivka znižuje, medtem ko se druga zvišuje. Obratno je pri pozitivni korelaciji, kjer se obe spremenljivki gibljeta v isto smer, torej ali se obe zvišujeta ali se obe znižujeta (66).

Računamo ga po enačbi (66):

$$\rho = 1 - 6 \sum \frac{d_i^2}{N(N^2 - 1)} \quad \text{Enačba 16}$$

kjer je d razlika med rangom spremenljivke X in rangom spremenljivke Y za posamezno enoto. Računamo ga tako, da vsem enotam v vzorcu določimo rang glede na spremenljivko X in glede na spremenljivko Y. N nam označuje skupno število meritev (66).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 TESTIRANJE

Pacientom so bili odvzeti vzorci seruma, kjer so najprej določili celotni PSA, prosti PSA in [-2]proPSA. Iz teh podatkov smo potem izračunali delež prostega PSA in phi. Pacientom so naredili tudi histološko analizo, na podlagi katere smo jih nato razdelili na dve skupini. V prvo skupino smo razvrstili vse z HGPIN (angl. High grade prostatic intraepithelial neoplasia), atrofijo, vnetjem in BHP, v drugo skupino pa bolnike s karcinomom prostate (pregledica II; preglednica III). Za določitev referenčnega intervala [-2]proPSA in phi so odvzeli serum tudi 20 zdravim preiskovancem.

Preglednica II: Skupina 1: Osebe, katerim so po biopsiji določili BHP, vnetje, atrofijo, HGPIN

Zapored na številka	Datum rojstva	Datum odvzema vzorca	Celotni PSA [$\mu\text{g/l}$]	Prosti PSA [%]	[-2] proPSA [ng/l]	Phi
1.	6.8.1956	6.12.2011	7,670	12,650	1,880	5,367
2.	10.1.1942	22.9.2009	4,390	9,570	1,050	5,238
3.	1.5.1943	6.12.2011	3,020	22,520	0,070	0,179
4.	10.8.1950	14.2.2012	4,330	12,470	1,090	4,200
5.	22.4.1944	19.12.2011	4,680	16,450	0,670	1,889
6.	26.4.1947	14.2.2012	3,820	18,850	0,010	0,030
7.	14.9.1958	2.12.2011	2,920	11,300	0,830	4,320
8.	22.4.1946	5.1.2012	4,380	19,630	2,380	5,790
9.	4.9.1937	21.1.2010	4,800	20,420	0,810	1,801

10.	29.8.1946	23.3.2010	4,840	12,600	0,290	1,050
11.	2.1.1945	6.12.2011	4,080	36,270	1,070	1,460
12.	29.7.1937	12.1.2009	2,770	12,640	0,630	3,009
13.	5.11.1947	6.12.2011	4,150	19,520	0,050	0,140
14.	27.5.1942	19.1.2010	4,810	21,830	4,310	9,010
15.	17.12.1946	21.1.2010	1,290	41,860	1,710	3,590
16.	8.3.1953	9.2.2012	5,080	16,730	0,030	0,090
17.	18.11.1941	19.12.2011	17,920	11,890	3,710	7,370
18.	18.9.1946	16.12.2011	3,130	19,810	0,010	0,029
19.	28.9.1944	15.12.2011	2,290	37,990	1,320	2,300
20.	4.7.1942	19.12.2011	3,900	22,310	0,010	0,020
21.	15.4.1951	13.12.2011	5,310	11,300	1,530	5,870
22.	15.5.1955	13.12.2011	4,090	22,741	0,330	0,720
23.	14.3.1941	13.12.2011	7,110	9,850	0,050	0,200

Preglednica III: Skupina 2: Osebe, katerim so po biopsiji določili karcinom prostate

Zaporedna številka	Datum rojstva	Datum odvzema vzorca	Celotni PSA [µg/l]	Prosti PSA [%]	[-2] proPSA [ng/l]	Phi
1.	6.5.1953	9.2.2012	11,440	5,860	3,650	18,439
2.	29.8.1932	8.12.2011	17,370	5,640	4,580	19,490
3.	8.4.1934	12.12.2011	7,010	20,110	1,310	2,46
4.	12.2.1935	18.1.2010	3,210	9,030	2,800	17,30
5.	5.7.1956	20.1.2012	5,530	7,410	0,010	0,06
6.	14.11.1934	12.12.2011	11,170	12,440	1,220	2,94

7.	19.7.1942	17.11.2009	5,570	8,620	2,560	12,60
8.	6.9.1928	12.1.2009	5,220	14,560	0,170	0,51
9.	28.10.1949	12.1.2009	3,010	22,590	0,900	2,3
10.	21.12.1941	1.4.2010	6,470	10,970	2,010	7,19
11.	14.7.1936	8.3.2010	5,340	13,110	4,200	13,85
12.	10.7.1949	13.2.2012	6,810	6,610	0,010	0,06
13.	20.7.1942	14.2.2012	7,980	12,780	0,580	1,59
14.	26.7.1930	9.2.2012	8,620	9,280	0,110	0,41
15.	11.7.1951	19.12.2011	17,001	14,180	4,940	8,45
16.	13.3.1960	13.2.2012	8,500	17,530	0,040	0,07
17.	28.1.1951	6.12.2011	3,330	7,210	0,130	0,98
18.	15.4.1954	8.12.2011	4,600	13,700	0,880	3,01
19.	1.1.1953	19.12.2012	4,361	20,180	2,180	5,18
20.	12.2.1946	1.12.2011	6,890	5,220	1,300	9,49
21.	9.5.1944	14.2.2012	5,490	13,840	0,010	0,03
22.	11.1.1942	5.1.2012	8,540	6,560	3,770	19,67
23.	8.3.1946	8.12.2011	6,17	13,290	0,380	1,15

Najprej smo obema skupinama določili parametre, ki nam dajo boljši vpogled v skupini pacientov, s katerimi bomo poskušali ovrednotiti tumorski označevalec [-2]proPSA in parameter phi. V preglednici IV smo opredelili povprečno starost pacientov v obeh skupinah ter mediani za koncentracijo PSA in delež prostega PSA.

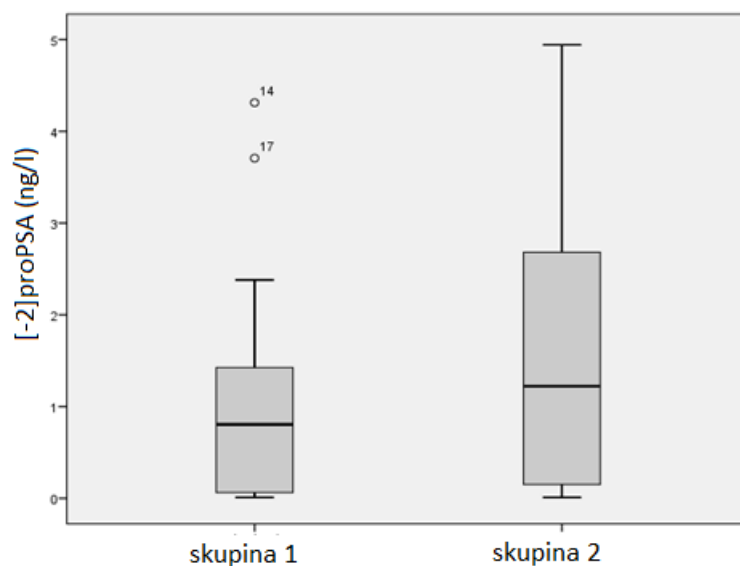
Preglednica IV: Osnovni izračuni za skupini pacientov

	Skupina 1	Skupina 2
Povprečna starost (leta)	64,8	67,0
Celotni PSA (območje, mediana) [µg/l]	1,29-17,92 (4,33)	3,01-17,37 (6,470)
Povp. vrednost deleža prostega PSA (območje,mediana) [%]	9,57-41,86 (18,850)	5,22-22,59 (12,440)

4.2 PRIMERJAVA STATISTIČNIH PARAMETROV MED SKUPINAMA

4.2.1 Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov meritev tumorskega označevalca [-2]proPSA

Na sliki 13 vidimo, da sta v skupini 1 dva osamelca, in sicer vrednost meritve pod številko 14 in vrednost meritve pod številko 17. Gre za vrednosti, ki preveč odstopata od povprečne vrednosti, zato ju izločimo iz nadaljnje analize. Obe meritvi bi namreč močno vplivali na vse vnaprej določene parametre in bi tako dobili sliko, ki ni realna. Skupinama smo nato določili vrednosti deskriptivnih statistik. Primerjali smo srednje vrednosti in standardne odklone koncentracij [-2]proPSA med skupino 1 in skupino 2. Iz preglednice V vidimo, da ima skupina 2 večjo vrednost aritmetične sredine in večji standardni odklon, kar pomeni, da so podatki bolj razpršeni. Podatkom smo določili tudi mediano, ki je prav tako kot aritmetična sredina, večja v skupini 2. Glede na to, da imamo nenormalno porazdeljene podatke in precej razpršene podatke v skupini 2, nam mediana boljše predstavlja statistični vzorec kot aritmetična sredina, na katero so vplivale najvišje vrednosti.



Slika 13: Kvartilni diagram meritev koncentracij tumorskega označevalca [-2]proPSA

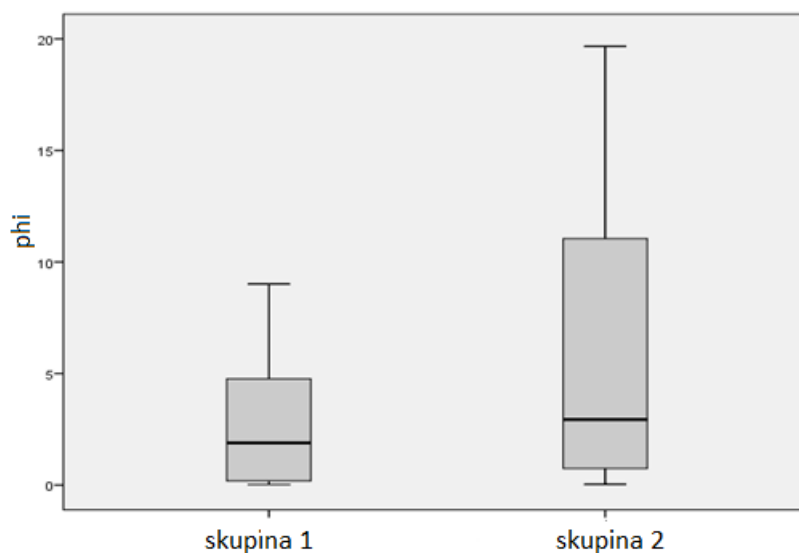
Preglednica V: Statistični parametri za tumorski označevalec [-2]proPSA

	Skupina 1	Skupina 2
Število vzorcev	21	23
Minimum (ng/l)	0,010	0,010
1.kvartil (ng/l)	0,0503	0,129
Mediana (2.kvartil) (ng/l)	0,670	1,221
3.kvartil (ng/l)	1,204	2,801
Maksimum (ng/l)	2,38	4,942
Aritmetična sredina (ng/l)	0,754	1,641
Standardni odklon	0,71041	1,636
Standardna napaka	0,11502	0,3411

4.2.2 Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov parametra phi

Za parameter phi smo naredili enako analizo podatkov kot za meritve [-2]proPSA.

Izračunali smo statistične parametre in izrisali kvartilni diagram. Iz preglednice VI vidimo, da je tudi tukaj aritmetična sredina skupine 2 veliko večja od aritmetične sredine skupine 1. Iz slike 14 in preglednice IX poleg tega opazimo, da so podatki v skupini 2 veliko bolj razpršeni kot podatki v skupini 1.



Slika 14: Kvartilni diagram za tumorski označevalec phi

Preglednica VI: Statistični parametri za parameter phi

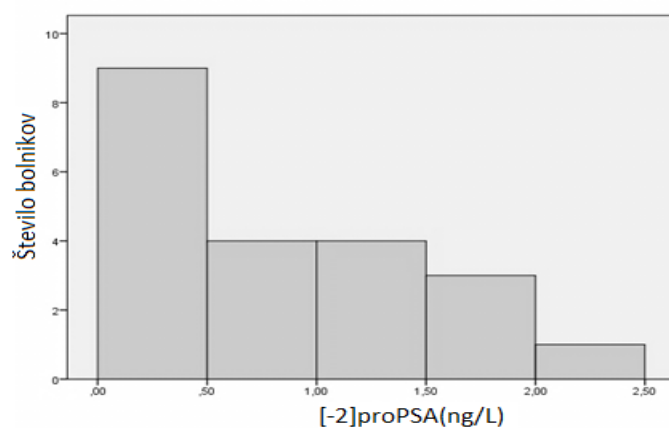
Število vzorcev	23	23
Minimum	0,020	0,030
1. kvartil	0,180	0,510
Mediana (2. kvartil)	1,890	2,940
3.kvartil	5,210	12,60
Maksimum	9,010	19,67
Aritmetična sredina	2,767	6,401
Standardna deviacija	2,676	7,034
Standardna napaka	0,558	1,467

4.2.3 Določitev porazdelitve podatkov

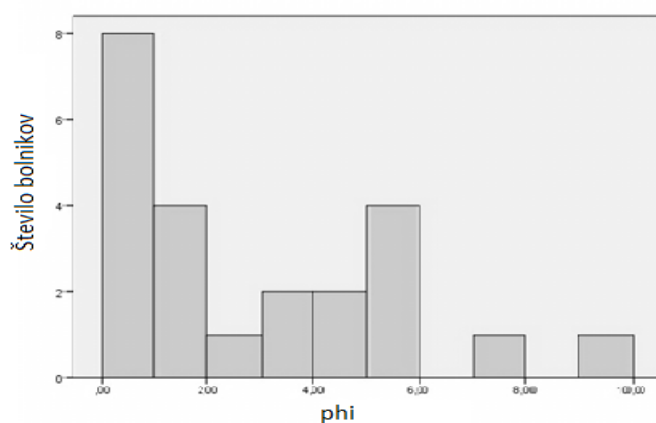
Z namenom določitve porazdelitve podatkov smo analizirali tako podatke v skupini 1 kot v skupini 2. Iz preglednice VII razberemo, da so podatki v skupini 1 nenormalno porazdeljeni. Slika 15 nam grafično prikaže nenormalnost porazdelitve koncentracij [-2]proPSA, slika 16 pa nenormalnost porazdelitev podatkov phi. Na obeh slikah vidimo, da ne dobimo tipične krivulje normalnosti.

Preglednica VII: Rezultati Shapiro-Wilkovega testa v skupini 1

	Shapiro-Wilkov test		
	Statistic	Število meritev	p
[-2]proPSA	0,900	21	0,035
phi	0,892	23	0,017



Slika 15: Prikaz porazdelitve podatkov [-2]proPSA v skupini 1

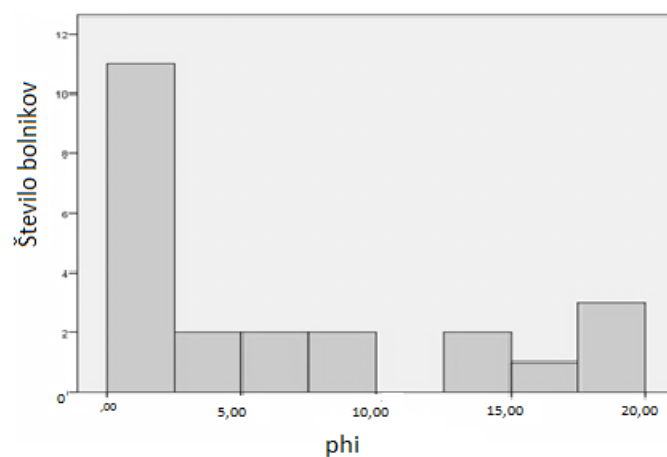


Slika 16: Prikaz porazdelitve podatkov phi v skupini 1

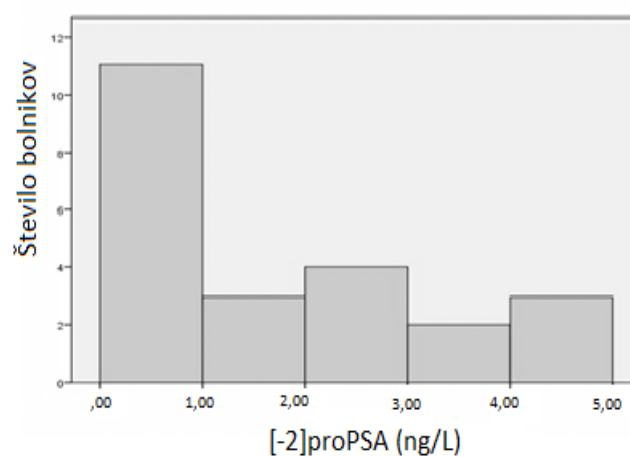
Preglednica VIII prikazuje rezultate testiranja normalnosti porazdelitve podatkov v skupini 2. Enako kot v prvi skupini so tako koncentracije [-2]proPSA kot phi nenormalno porazdeljene. Grafično ponazoritev porazdelitve vidimo na sliki 17 za phi in sliki 18 za [-2]proPSA.

Preglednica VIII: Rezultati testiranja normalnosti porazdelitve s Shapiro-Wilkovim testom v skupini 2.

	Shapiro-Wilkov test		
	Statistic	Število meritev	p
[-2]proPSA	0,869	23	0,006
phi	0,817	23	0,001



Slika 17: Prikaz porazdelitve podatkov phi v skupini 2



Slika 18: Prikaz porazdelitve koncentracij tumorskega označevalca [-2]proPSA v skupini 2.

4.3 UGOTAVLJANJE RAZLIK V KONCENTRACIJI [-2]proPSA IN V VREDNOSTIH PARAMETRA phi MED SKUPINO 1 IN SKUPINO 2

Glede na to, da so podatki v obeh skupinah nenormalno porazdeljeni, smo za ugotavljanje razlik v koncentraciji tumorskega označevalca [-2]proPSA in phi uporabili Mann-Whitneyev test, imenovan tudi Wilcoxonov test vsote rangov.

4.3.1 Ugotavljanje razlik v koncentraciji [-2]proPSA med skupinama

Postavili smo dve hipotezi:

$H_0: P(X_i > Y_i) = \frac{1}{2}$; verjetnost, da meritev iz skupine X preseže meritev iz skupine Y, je enaka verjetnosti, da meritev iz skupine Y preseže meritev iz skupine X

$H_1: P(X_i > Y_i) \neq \frac{1}{2}$; verjetnost, da meritev iz skupine X preseže meritev iz skupine Y ni enaka 0,5.

Preglednica IX: Povprečni rang in vsota rangov za tumorski označevalec [-2]proPSA v skupini 1 in 2

[-2]proPSA	Skupina	Število meritev	Povprečni rang	Vsota rangov
	1	21	19,31	405,50
	2	23	25,41	584,50
	Skupaj	44		

Iz preglednice IX razberemo, da je povprečni rang prve skupine manjši od povprečnega ranga druge skupine. Z nadaljnjo analizo preverimo, če je ta razlika statistično značilna.

Preglednica X: Rezultati testiranja z Mann-Whitney testom

	[-2]proPSA (ng/L)
Mann-Whitney U	174,500
Wilcoxon W	405,500
Z	-1,576
p	0,115

Iz preglednice X razberemo vrednost p , ki znaša 0,115. Ta vrednost je večja od 5 % stopnje tveganja, zato lahko ničelno hipotezo potrdimo oziroma zavrnilo alternativno hipotezo. Z gotovostjo lahko potrdimo, da med skupinama ni statistično značilne razlike in torej prihajata iz iste populacije.

4.3.2 Ugotavljanje razlik v vrednostih parametra ϕ med skupinama

Pri ugotavljanju razlik v vrednostih parametra ϕ ponovimo zgoraj opisan posotopek. Najprej postavimo ničelno hipotezo, ki pravi, da med skupinama ni statistično značilne razlike v izračunanem ϕ in alternativno, ki temu nasprotuje. Nato z Mann-Whitney testom izvedemo analizo podatkov.

Preglednica XI: Povprečni rang in vsota rangov za ϕ v skupini 1 in 2

	skupina	Število meritev	Povprečni rang	Vsota rangov
ϕ	1,00	23	20,87	480,00
	2,00	23	26,13	601,00
	Skupaj	46		

Iz preglednice XI razberemo, da je povprečni rang skupine 2 večji od povprečnega ranga skupine 1. S 5 % stopnjo tveganja nato preverimo ali gre za statistično značilno razliko. Vrednost izračunanega p je večja od 0,05, zato lahko rečemo, da razlika ni statistično značilna (preglednica XII).

Med izračunanim ϕ v skupini 1 in izračunanim ϕ v skupini 2 ni statistično značilne razlike, torej obe skupini prihajata iz iste populacije.

Preglednica XII: Rezultati testiranja z Mann-Whitney testom

	ϕ
Mann-Whitney U	204,000
Wilcoxon W	480,000
Z	-1,329
p	0,184

4.4 DOLOČANJE REFERENČNE VREDNOSTI ZA TUMORSKI OZNAČEVALEC [-2]proPSA IN ZA PARAMETER phi

4.4.1 Meritve

Za določanje referenčne vrednosti smo uporabili rezultate kontrolne skupine, v kateri so zdravi preiskovanci. Preiskovancem so določili koncentracijo PSA, koncentracijo prostega PSA in koncentracijo [-2]proPSA. Nato smo iz teh podatkov izračunali phi (preglednica XIII).

Preglednica XIII: Meritve kontrolne skupine z zdravimi preiskovanci

	PSA [$\mu\text{g/L}$]	PROSTI PSA [$\mu\text{g/L}$]	[-2]proPSA [ng/L]	phi
1.	0,060	<0,030	0,041	0,335
2.	0,610	0,220	0,023	0,082
3.	1,970	0,560	0,090	0,226
4.	2,670	0,150	0,140	1,525
5.	2,400	0,330	0,050	0,235
6.	1,290	0,540	0,027	0,057
7.	2,200	0,960	0,111	0,171
8.	0,430	0,120	0,019	0,104
9.	2,470	0,530	0,080	0,237
10.	1,020	0,340	0,055	0,163
11.	2,230	0,130	0,032	0,368
12.	2,810	0,730	0,057	0,131
13.	2,440	0,590	0,050	0,132
14.	0,210	0,120	0,050	0,191
15.	0,050	0,030	0,020	0,149
16.	0,140	0,070	0,090	0,481
17.	0,050	0,030	0,060	0,447
18.	0,050	0,030	0,070	0,523
19.	2,610	0,580	0,140	0,389
20.	0,920	0,120	0,120	0,959

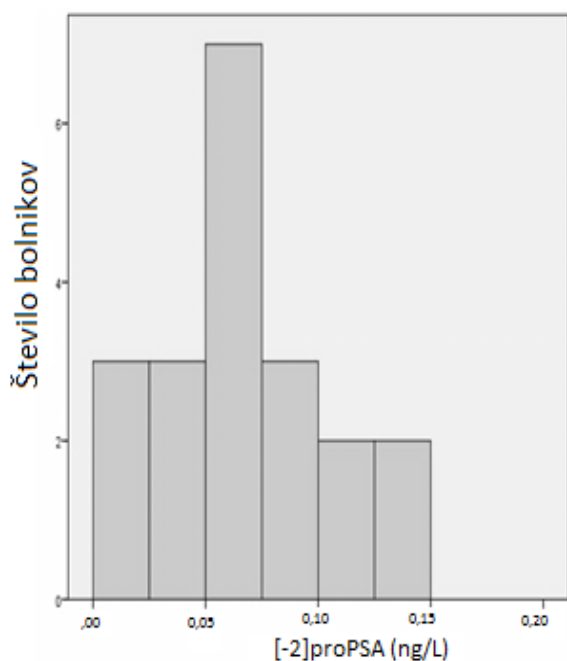
4.4.2 Določanje porazdelitve podatkov kontrolne skupine

S Shapiro-Wilkov testom smo v kontrolni skupini testirali normalnost porazdelitve. Predhodno smo že preverili tudi prisotnost osamelcev. Ugotovili smo, da sta med izračunanimi vrednostmi ϕ 2 osamelca. Oba smo izločili iz analize normalnosti porazdelitve podatkov.

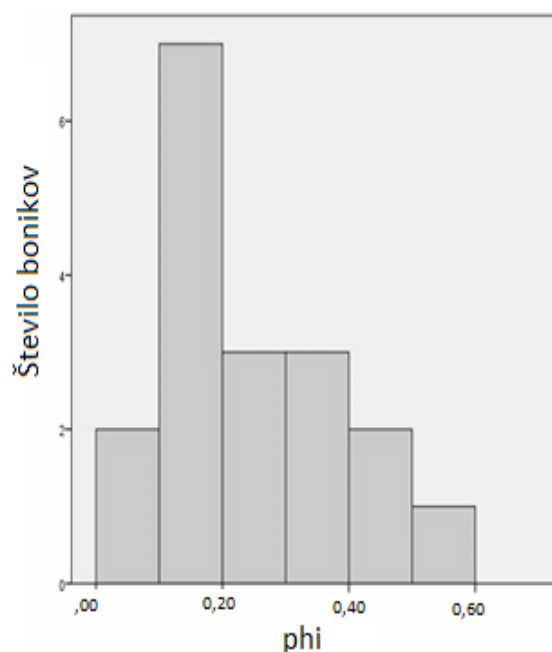
Preglednica XIV: Rezultati testiranja porazdelitve v kontrolni skupini

	Shapiro-Wilkov test		
	Statistic	Število meritev	p
[-2]proPSA	0,908	20	0,057
phi	0,918	18	0,118

V preglednici XIV vidimo, da je p vrednost za meritve [-2]proPSA večja od 0,05 in da je p vrednost za izračunane ϕ večja od 0,05, torej lahko trdimo, da se podatki [-2]proPSA in ϕ v kontrolni skupini porazdeljujejo normalno. To nam potrjuje tudi grafični prikaz porazdelitve podatkov na sliki 19 in na sliki 20.



Slika 19: Prikaz porazdelitev podatkov [-2]proPSA



Slika 20: Prikaz porazdelitve podatkov ϕ

4.4.3 Izračun referenčnega intervala

Za vse nadaljnje izračune in ugotovitve smo potrebovali tudi mejne/referenčne vrednosti, ki nam bodo pomagale opredeliti diagnostične zmožnosti tumorskega označevalca [-2]proPSA in parametra phi. Podatki potrebni za izračun referenčne vrednosti za oba parametra so navedeni v preglednici XV. Meritve v kontrolni skupini so porazdeljene normalno, zato za izračun referenčnega intervala uporabimo metodo, ki je podrobno opisana v poglavju Materiali in metode.

Preglednica XV: Podatki za izračun referenčnega intervala

	[-2]proPSA	phi
Aritmetična sredina	0,066 (ng/L)	0,246
Standardni odklon	0,0382	0,0338
T vrednost pri 97,5 % intervalu zaupanja in stopinjah prostosti (n-1)=19	2,093	2,110
Število meritev	20	18

Po vnosu podatkov v formulo dobimo sledeče rezultate:

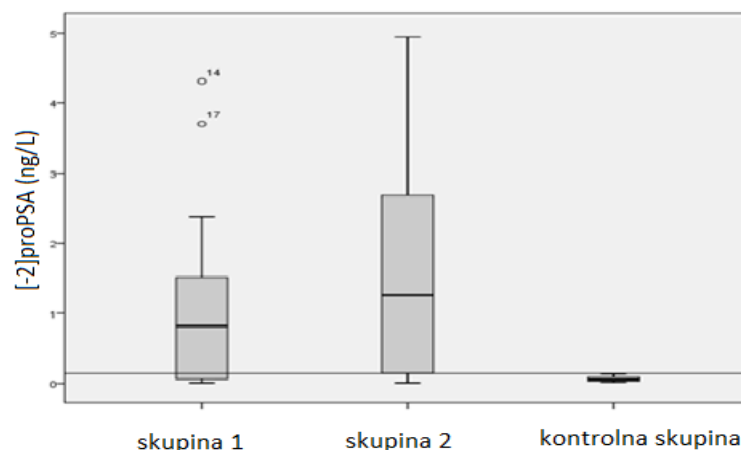
[-2]proPSA: Spodnja meja intervala= -0,016 [ng/l]

Zgornja meja intervala= 0,148 [ng/l]

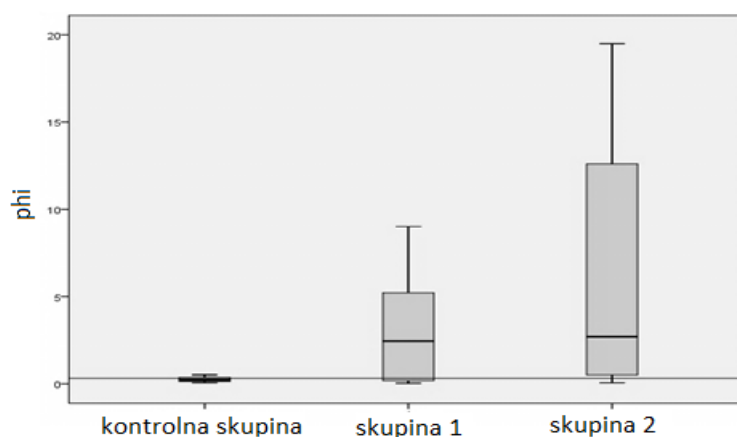
phi: Spodnja meja intervala= 0,172

Zgornja meja intervala= 0,319

Zgornja meja intervala nam določa mejo, pri kateri štejemo rezultat za pozitiven oziroma negativen. Spodnjo mejo ne upoštevamo, saj je pri meritvah koncentracije [-2]proPSA spodnja meja negativna in torej teoretično ni možno, da to vrednost uporabimo za ločevanje med pozitivnimi in negativnimi rezultati. Torej vse koncentracije [-2]proPSA in vsi zračunani phi, ki so nad mejo 0,148 ng /l za [-2]proPSA oziroma 0,319 za phi, pomenijo pozitiven izid oziroma prisotnost karcinoma prostate.



Slika 21: Kvartilni diagram za vse tri skupine za tumorski označevalec [-2]proPSA. Vodoravna črta ponazarja izračunano referenčno vrednost.



Slika 22: Kvartilni diagram za vse tri skupine za phi. Vodoravna črta ponazarja izračunano referenčno vrednost.

Če pogledamo sliko 21 vidimo, da so meritve kontrolne skupine pod referenčno mejo, meritve skupine 1 pa večinoma nad referenčno mejo. Pričakovali bi, da bodo vse meritve iz skupine 1 pod referenčno vrednostjo. V nasprotnem primeru pa bi pričakovali, da bodo vse meritve skupine 2 nad referenčno vrednostjo, ker gre za osebe s karcinomom prostate. Razen porazdelitve podatkov kontrolne skupine na sliki 20, se ostalo ne sklada z našimi pričakovanji. Torej že iz tega grafa vidimo, da tumorski označevalec oziroma metoda ne bo učinkovita v ločevanju med karcinomom prostate in nemalignimi boleznimi prostate. Enako velja za parameter phi, kjer iz slike 22 vidimo, da je v tem primeru celo kontrolna skupina deloma nad referenčno vrednostjo. To nikakor ni v skladu z lastnostmi tumorskega označevalca, ki bo dobro ločeval med zdravimi pacienti/pacienti z nemalignimi obolenji in pacienti s karcinomom prostate.

4.5 DOLOČANJE SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI

4.5.1 Določanje specifičnosti in občutljivosti tumorskega označevalca [-2]proPSA in parametra phi glede na kontrolno skupino

Potem, ko smo imeli določeno referenčno vrednost, smo lahko določili tudi specifičnost in občutljivost tumorskega označevalca [-2]proPSA in phi. Najprej smo primerjali kontrolno skupino s skupino bolnikov s karcinomom prostate.

Preglednica XVI: Statistični parametri za skupino 2 in kontrolno skupino

	[-2]proPSA (ng/L)		phi	
	Skupina 2	Kontrolna skupina	Skupina 2	Kontrolna skupina
Število meritev	23	20	23	18
Minimum (ng/L)	0,010	0,020	0,03	0,06
Maksimum (ng/L)	4,940	0,140	19,67	0,52
Aritmetična sredina (ng/L)	1,641	0,066	6,401	0,246
Standardna deviacija	1,636	0,038	7,034	0,0338

Iz preglednice XVI vidimo, da je razlika med povprečnima vrednostima skupine 2 in kontrolne skupine tako pri [-2]proPSA kot phi zelo velika. Želimo ugotoviti, ali je ta razlika statistično značilna.

Postavimo hipotezo:

H_0 : razlika med povprečjema je statistično značilna

H_1 : razlika med povprečjema ni statistično značilna

Uporabimo Mann-Whitney test glede na to, da so podatki v skupini 2 nenormalno porazdeljeni. Rezultati analize v preglednici VII pokažejo, da je $p < 0,05$ tako za [-2]proPSA kot za phi. Posledično ničelno hipotezo sprejmemo in lahko rečemo, da je razlika v povprečnih vrednostih koncentracije [-2]proPSA in povprečnih vrednostih izračunanega phi med skupinama statistično značilna. Iz preglednice XIX vidimo, da sta povprečni vrednosti koncentracije [-2]proPSA in povprečni vrednosti izračunanega phi statistično večji v skupini 2 glede na kontrolno skupino. To se sklada z našimi

pričakovanji, ker pričakujemo da je tumorski označevalec povečan v serumu bolnikov s karcinomom prostate.

Preglednica XVII: Rezultati testiranja z Mann -Whitney testom

	[-2]proPSA	phi
Mann-Whitney U	80,500	102,00
Z	-3,642	-2,759
p	0,000	0,006

Na podlagi izračunane referenčne vrednosti smo nato izdelali tudi kontingenčni tabeli (preglednica XVIII, preglednica XIX) , kjer smo podatke razvrstili na resnično pozitivne in resnično negativne rezultate ter lažno pozitivne in lažno negativne rezultate. S temi rezultati smo nato izračunali diagnostično specifičnost in diagnostično občutljivost.

Preglednica XVIII: Kontingenčna tabela za koncentracije [-2]proPSA

		TEST	
		Št. bolnikov s pozitivnim izidom testa	Št. bolnikov z negativnim izidom testa
BOLEZEN	Število bolnikov s prisotno boleznijo	17 resnično pozitivnih rezultatov	6 lažno negativnih rezultatov
	Število bolnikov brez bolezni	0 lažno pozitivnih rezultatov	20 resnično negativnih rezultatov

Preglednica XIX: Kontingenčna tabela za parameter phi

		TEST	
		Št. bolnikov s pozitivnim izidom testa	Št. bolnikov z negativnim izidom testa
BOLEZEN	Število bolnikov s prisotno boleznijo	19 resnično pozitivnih rezultatov	4 lažno negativnih rezultatov
	Število bolnikov brez bolezni	6 lažno pozitivnih rezultatov	12 resnično negativnih rezultatov

Vrednosti iz preglednice XVIII in XIX smo uporabili za določitev diagnostične specifičnosti in občutljivosti ter pozitivne in negativne napovedne vrednosti za tumorski označevalec [-2]proPSA in parameter phi.

[-2]proPSA

Diagnostična občutljivost = 73,9 %

Diagnostična specifičnost = 100 %

Pozitivna napovedna vrednost = 100 %

Negativna napovedna vrednost = 76,9 %

phi

Diagnostična občutljivost = 82,6 %

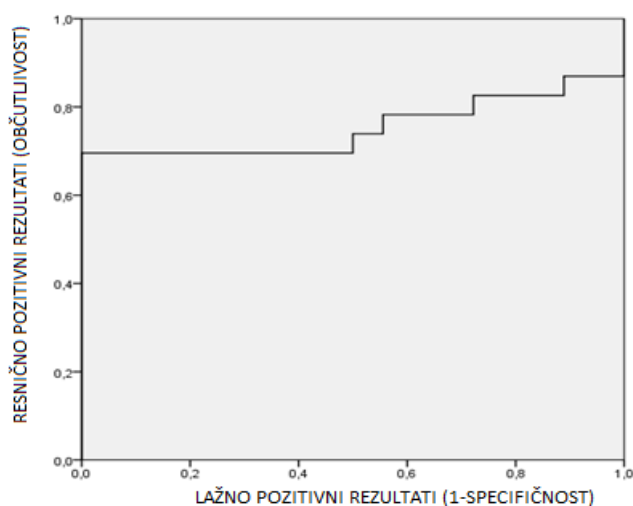
Diagnostična specifičnost = 66,7%

Pozitivna napovedna vrednost = 61,3%

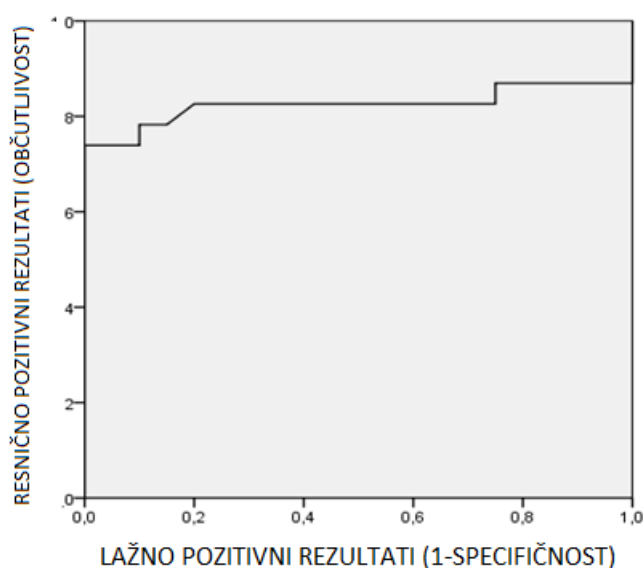
Negativna napovedna vrednost = 75%

Izračuni so za tumorski označevalec [-2]proPSA pokazali najvišjo možno specifičnost testa in pozitivno napovedno vrednost, prav tako zelo visoko občutljivost in negativno napovedno vrednost testa. 100 % specifičnost testa nam pove, da bo test pokazal negativen izid, pri vseh osebah pri katerih smo predhodno z biopsijo ugotovili, da karcinom prostate ni prisoten. Pozitivna napovedna vrednost testa, ki znaša 100 %, nam pove da bo pri vseh osebah tudi z biopsijo dokazan karcinom prostate, če je bil test za parameter [-2]proPSA v serumu pozitiven. Visoka negativna napovedna vrednost testa nam pove verjetnost, da karcinoma prostate ni, če so meritve [-2]proPSA pod referenčno vrednostjo.

Za parameter phi smo dobili nekoliko boljšo občutljivost, vendar precej slabšo specifičnost. Tudi obe napovedni vrednosti sta precej slabši. Pozitivna napovedna vrednost testa, nam pove, da bo pri 61,3 % osebah tudi z biopsijo dokazan karcinom prostate, če je bil test za parameter phi pozitiven. Negativna napovedna vrednost testa, nam pove, da pri 75 % oseb z biopsijo ne bo dokazan karcinom prostate, če bo test za parameter phi negativen. Na podlagi zgoraj pridobljenih podatkov smo s pomočjo statističnega programa nato izrisali krivuljo ROC.



Slika 23: Krivulja ROC za tumorski označevalec phi. Primerjava meritev med kontrolno skupino in skupino bolnikov s karcinomom prostate



Slika 24: Krivulja ROC za tumorski označevalec [-2]proPSA. Primerjava meritev med kontrolno skupino in skupino bolnikov s karcinomom prostate

Na podlagi izrisane krivulje in iz podatkov, ki smo jih pridobili iz krivulje (preglednica XX; preglednica XXI) smo s premikanjem referenčne vrednosti poskušali najiti kombinacijo specifičnosti in občutljivosti, ki nam bo pomagala definirati najbolj optimalno referenčno vrednost.

Če bi referenčno vrednost tumorskega označevalca [-2]proPSA premaknili na 0,101 ng/L, bi na račun manjše specifičnosti pridobili na občutljivosti. V tem primeru bi občutljivost znašala 82,61 % in specifičnost 80 % (preglednica XX, slika 24).

Iz krivulje za phi (slika 23) in iz preglednice XXI pa vidimo, da če bi referenčno vrednost za phi dvignili celo na 0,399 bi obdržali enako občutljivost (82,6%), specifičnost pa bi dvignili na 83,3%.

Preglednica XX: Resnično pozitivni rezultati (občutljivost), lažno pozitivni rezultati (1-specifičnost) in specifičnost pri različnih referenčnih vrednostih za tumorski označevalec [-2]proPSA.

Mejna vrednost(ng/L)	Resnično pozitivni rezultati (občutljivost)	Lažno pozitivni rezultati (=1-specifičnost)	Specifičnost
0,0145	0,8696	1,000	0,000
0,0195	0,8696	0,950	0,050
0,0215	0,8696	0,900	0,100
0,0250	0,8696	0,850	0,150
0,0295	0,8696	0,800	0,200
0,0350	0,8696	0,750	0,250
0,0395	0,8261	0,750	0,250
0,0455	0,8261	0,700	0,300
0,0525	0,8261	0,550	0,450
0,0560	0,8261	0,500	0,500
0,0585	0,8261	0,450	0,550
0,0700	0,8261	0,350	0,650
0,0850	0,8261	0,300	0,700
0,1005	0,8261	0,200	0,800
0,1155	0,7826	0,150	0,850
0,1245	0,7826	0,100	0,900
0,1345	0,7391	0,100	0,900
0,1555	0,7391	0,000	1,000
0,2745	0,6957	0,000	1,000
0,4765	0,6522	0,000	1,000
0,7295	0,6087	0,000	1,000
0,8925	0,5652	0,000	1,000
1,061	0,5217	0,000	1,000
1,262	0,4783	0,000	1,000

1,306	0,4348	0,000	1,000
1,658	0,3913	0,000	1,000
2,096	0,3478	0,000	1,000
2,374	0,3043	0,000	1,000
2,682	0,2609	0,000	1,000
3,227	0,2174	0,000	1,000
3,711	0,1739	0,000	1,000
3,982	0,1304	0,000	1,000
4,390	0,08696	0,000	1,000
4,763	0,04348	0,000	1,000

Preglednica XXI: Resnično pozitivni rezultati (=občutljivost), lažno pozitivni rezultati (1-specificičnost) in specifičnost pri različnih mejnih/referenčnih vrednostih za parameter phi.

Mejna vrednost	Resnično pozitivni rezultati (občutljivost)	Lažno pozitivni rezultati (1 – specifičnost)	Specifičnost
-,9700	1,000	1,000	0,000
0,0435	0,957	1,000	0,000
0,0585	0,957	0,944	0,056
0,0650	0,870	0,944	0,056
0,0760	0,826	0,944	0,056
0,0930	0,826	0,889	0,111
0,1175	0,826	0,833	0,167
0,1315	0,826	0,778	0,222
0,1405	0,826	0,722	0,278
0,1560	0,826	0,667	0,333
0,1670	0,826	0,611	0,389
0,1810	0,826	0,556	0,444
0,2085	0,826	0,500	0,500
0,2305	0,826	0,444	0,556
0,2360	0,826	0,389	0,611
0,2860	0,826	0,333	0,667
0,3515	0,826	0,278	0,722

0,3785	0,826	0,222	0,778
0,3995	0,826	0,167	0,833
0,4285	0,783	0,167	0,833
0,4640	0,783	0,111	0,889
0,4955	0,783	0,056	0,944
0,5159	0,739	0,056	0,944
0,7509	0,739	0,000	1,000
1,0650	0,696	0,000	1,000
1,3700	0,652	0,000	1,000
1,9450	0,609	0,000	1,000
2,3800	0,565	0,000	1,000
2,7000	0,522	0,000	1,000
2,9750	0,478	0,000	1,000
4,0950	0,435	0,000	1,000
6,1850	0,391	0,000	1,000
7,8200	0,348	0,000	1,000
8,9700	0,304	0,000	1,000

V preglednici XXII in preglednici XXIII smo zbrali izračunane AUC vrednosti za oba parametra.

Preglednica XXII: Izračun AUC in vrednosti p za tumorski označevalec [-2]proPSA.

AUC	0,821
Standardna napaka	0,07473
95% interval zaupanja	0,679 do 0,979
p	0,000272

Preglednica XXIII: Izračun AUC in vrednosti p za parameter phi

AUC	0,824
Standardna napaka	0,076
95% interval zaupanja	0,675 do 0,973
p	0,0000

V tem primeru lahko rečemo glede na visoko vrednost AUC za tumorski označevalec [-2]proPSA (0,821), da večje koncentracije tumorskega označevalca glede na zdrave preiskovance predstavljajo večjo verjetnost za prisotnost karcinoma. Koncentracija [-2]proPSA se statistično značilno razlikuje od koncentracije [-2]proPSA v kontrolni skupini ($p < 0,05$). Rezultati v preglednici XXIII nam enako potrjujejo tudi za parameter phi, kjer je AUC celo malenkost večja od vrednosti AUC za tumorski označevalec [-2]proPSA.

4.6 SPECIFIČNOST IN OBČUTLJIVOST GLEDE NA NEMALIGNNE BOLEZNI PROSTATE

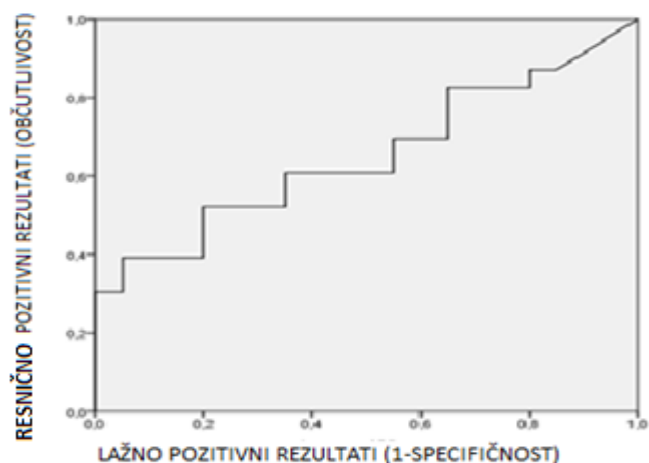
4.6.1 Specifičnost in občutljivost tumorskega označevalca [-2]proPSA

Ker nas najbolj zanima sposobnost ločevanja našega tumorskega označevalca med skupino z nemalignimi obolenji in skupino s karcinomom prostate, smo določili AUC ter občutljivost in specifičnost s primerjavo meritev skupine 1 in skupine 2.

Preglednica XXIV: Izračun AUC in vrednosti p za tumorski označevalec [-2]proPSA

AUC	0,651
Standardna napaka	0,084
95% interval zaupanja	0,486 do 0,816
P	0,091

AUC vrednost se je z zamenjavo kontrolne skupine s skupino pacientov z nemalignimi boleznimi (skupina 1) precej zmanjšala (preglednica XXIV, slika 25). Tudi p vrednost je večja od 0,05, kar pomeni da ni statistično značilne razlike v koncentraciji tumorskega označevalca [-2]proPSA med rakavimi bolniki in bolniki z nemalignimi boleznimi.

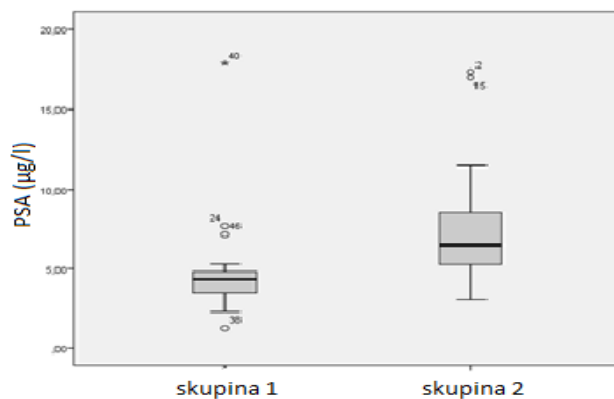


Slika 25: Krivulja ROC za tumorski označevalec [-2]proPSA. Primerjava meritev med skupino bolnikov s karcinomom prostate in skupino bolnikov z nemalignimi boleznimi.

Pri zgoraj določeni referenčni vrednosti (0,148 ng/L) je specifičnost 35 %, občutljivost pa 78,3 %. Pri 90 % občutljivosti je specifičnost 14 %.

4.6.2 Specifičnost in občutljivost celokupne koncentracije PSA

Tudi pri določevanju specifičnosti in občutljivosti celokupne koncentracije PSA najprej določimo prisotnost osamelcev, ki jih nato izločimo iz nadaljnje analize. Osamelce najdemo tako v skupini 1 kot v skupini 2 (slika 26).

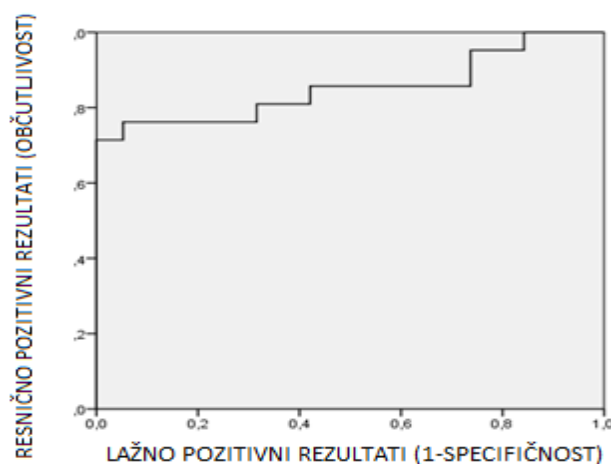


Slika 26: Kvartilni diagram meritev PSA za skupino 1 in skupino 2

Vrednosti v preglednici XXV in slika 27 nam predstavljata razmerje med resnično pozitivnimi in lažno pozitivnimi rezultati, če za ločevanje med pacienti uporabimo tumorski označevalec PSA.

Preglednica XXV: Izračun AUC in vrednosti p za tumorski označevalec PSA

AUC	0,817
Standardna napaka	0,07119
95 % interval zaupanja	0,678 do 0,957
p vrednost	0,0006172

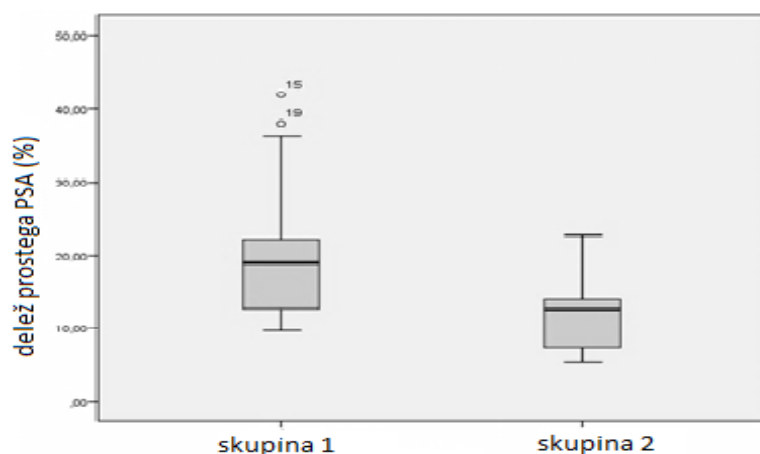


Slika 27: ROC krivulja za tumorski označevalec PSA. Primerjava meritev med skupino bolnikov s karcinomom prostate in skupino bolnikov z nemalignimi boleznimi.

Pri referenčni vrednosti 3 $\mu\text{g/l}$ je tumorski označevalec PSA pokazal 95,2 % občutljivost in 15,8 % specifičnost. Prav tako je p vrednost manjša od 0,05 kar pripomore k ugotovitvi, da je med pacienti z nemalignimi boleznimi in pacienti s karcinomom prostate statistično značilna razlika v koncentraciji PSA. Pri 90% občutljivosti je specifičnost 15,8 %.

4.6.3 Specifičnost in občutljivost deleža prostega PSA

Najprej smo naredili analizo z namenom določitve osamelcev. V skupini 1 sta bila dva in ta smo nato izključili iz nadaljnje analize (slika 28).

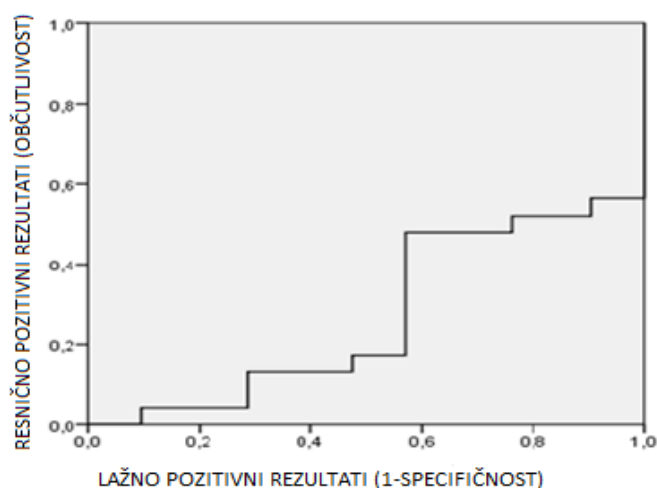


Slika 28: Kvartilni diagram za skupino 1 in skupino 2

Preglednica XXVI: Izračun AUC in vrednosti p za tumorski označevalec delež prostega PSA

AUC	0,269
Standardna napaka	0,076
95 % interval zaupanja	0,120 do 0,418
p vrednost	0,009

AUC vrednost za delež prostega PSA (preglednica XXVI, slika 29) je precej manjša od vrednosti AUC za tumorski označevalec PSA in za tumorski označevalec [-2]proPSA.

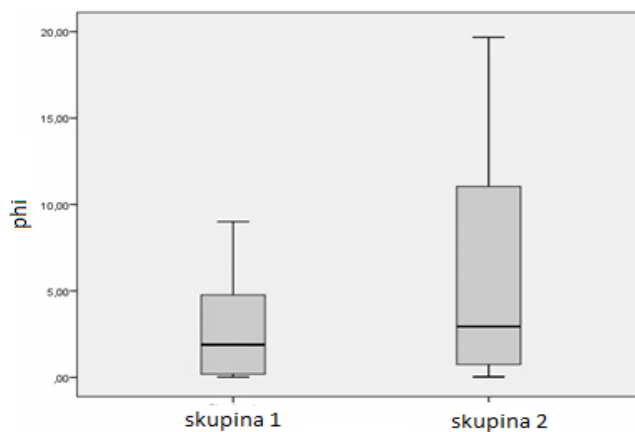


Slika 29: ROC krivulja za delež prostega PSA. Primerjava meritev med skupino bolnikov s karcinomom prostate in skupino bolnikov z nemalignimi boleznimi.

Pri mejni vrednosti 13 % prostega PSA je občutljivost 40 % in specifičnost 57,1 %. Pri 90 % občutljivosti, je specifičnost enaka 0 %.

4.6.4 Specifičnost in občutljivost phi

Tudi tukaj smo najprej naredili analizo z namenom izločitve osamelcev. Niti v skupini 1 niti v skupini 2 nismo našli osamelca (slika 30).

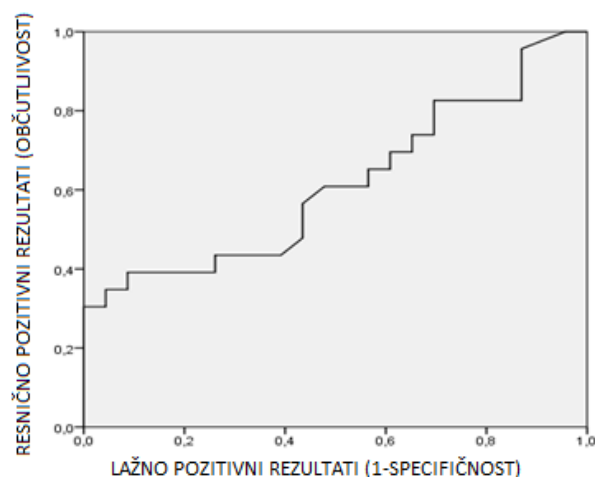


Slika 30: Kvartilni diagram za vrednosti phi za skupino 1 in skupino 2

Preglednica XXVII: Izračun AUC in vrednosti p za parameter phi

AUC	0,614
Standardna napaka	0,085
95 % interval zaupanja	0,449 do 0,780
p vrednost	0,184

AUC vrednost in p vrednost v preglednici XXVII nam povesta, da je phi v ločevanju med skupino 1 in skupino 2 nekoliko boljši od [-2]proPSA in deleža prostega PSA, vendar še vedno veliko slabši od PSA. Grafičen rikaz razmerja med lažno pozitivnimi rezultati in resnično pozitivnimi rezultati vidimo na sliki 31.



Slika 31: Krivulja ROC za tumorski označevalec phi. Primerjava meritev med skupino bolnikov s karcinomo prostate in skupino bolnikov z nemalignimi boleznimi.

Pri mejni vrednosti 0,319 je občutljivost 80 %, specifičnost pa 30,4 %. Pri 90 % občutljivosti je specifičnost 13 %.

4.7 DOLOČEVANJE SPECIFIČNOSTI IN OBČUTLJIVOSTI NA SKUPINI BOLNIKOV, KATERIH KONCENTRACIJA PSA SE NAHAJA V »SIVI CONI«

Iz skupine 1 in 2 smo izbrali le skupino bolnikov, katerih vrednosti tumorskega označevalca PSA se nahajao v ti. območju diagnostične »sive cone«.

Pri vseh meritvah (koncentracija PSA, delež prostega PSA, koncentracija [-2]proPSA) in za izračunan phi smo med vsemi meritvami najprej določili osamelce, katere smo izločili iz nadaljnje analize. Nato smo iz zbranih meritev določili AUC. Rezultati z grafi so v dodatku I. Poleg tega smo iz ROC krivulje vseh 4 parametrov določili specifičnost pri 90% občutljivosti.

Iz preglednice XXVIII razberemo, da ima največji AUC tumorski označevalec PSA, sledita mu z medsebojno majhno razliko phi in [-2]proPSA. Najslabši rezultat smo dobili pri deležu prostega PSA (AUC=0,294). Zadnji označevalec torej nikakor ni primeren za ločevanje med nemalignimi in malignimi obolenji.

Preglednica XXVIII: Vrednosti parametrov v območju diagnostične »sive cone« za tumorski označevalec PSA.

	[-2]proPSA	phi	PSA	delež prostega PSA
AUC	0,560	0,581	0,777	0,294
Standardna napaka	0,093	0,093	0,078	0,086
95 % interval zaupanja	0,377 do 0,743	0,400 do 0,763	0,624 do 0,930	0,125 do 0,462
p vrednost	0,516	0,379	0,003	0,03

Pri 90% občutljivosti je specifičnost znašala (naštevajoč po naraščajočih vrednostih): za prosti PSA 0 %, za [-2]proPSA 8,4 %, za phi 14,3 % in za PSA 24 %.

4.8 MOČ POVEZAVE MED SPREMENLJIVKAMI (KORELACIJA)

Določili smo tudi moč povezave med spremenljivkami. Za signifikantno ($p < 0,05$) se je izkazala edino povezava med koncentracijo PSA in deležem prostega PSA (preglednica XXIX).

Preglednica XXIX: Izračun Spearmanovega koeficienta pri določevanju moči povezave med koncentracijami PSA in med deležem prostega PSA.

	PSA/ delež prostega PSA
r	-0,3345
95 % interval zaupanja	-0,5885 to -0,02048
p	0,0325

Višje absolutne vrednosti nam določajo večjo stopnjo povezave. Glede na to, da smo dobili negativno korelacijo, nam to pove da se vrednosti ene spremenljivke zmanjšujejo, medtem ko se vrednosti druge spremenljivke povečujejo. P vrednost je v tem primeru manjša od postavljene 5 % stopnje tveganja, zato lahko rečemo da gre za statistično značilno povezavo med koncentracijo PSA in deležem prostega PSA.

5 SKLEP

Tako tumorski označevalec [-2]proPSA kot parameter phi v naši raziskavi nista potrdila vloge favoritov med trenutno uporabljenimi tumorskimi označevalci v diagnostiki karcinoma prostate. Prišli smo do sledečih ugotovitev:

1. Tumorski označevalec [-2]proPSA in izračunan parameter phi sta z visoko vrednostjo AUC dokazala, da dobro ločujeta med zdravimi preiskovanci in skupino bolnikov s karcinomom prostate.
2. Verjetnost ločevanja med bolniki s karcinomom prostate in bolniki z nemalignimi boleznimi (npr. BHP) z uporabo tumorskega označevalca [-2]proPSA in phi, pa se ni izkazala za statistično značilno. Torej imata tako tumorski označevalec [-2]proPSA kot phi majhno vrednost v (zgodnji) diagnostiki karcinoma prostate. Največjo verjetnost za ločevanje smo določili za tumorski označevalec PSA, ki je imel največjo AUC vrednost in najvišjo specifičnost pri 90 % občutljivosti.
3. Pri opredelitvi skupine bolnikov z nemalignimi boleznimi in skupine bolnikov s karcinomom prostate na le tiste, ki imajo vrednost PSA v t.i. diagnostični »sivi coni«, pa smo dobili še slabše rezultate za tumorski označevalec [-2]proPSA in parameter phi. Vrednosti AUC sta pri obeh znašali le nekaj več kot 0,500, kar pomeni da nista primerni za uporabo v diagnostične namene. V tem primeru se je presenetljivo za najboljšega izkazal tumorski označevalec PSA, ki je imel največjo vrednost AUC in največjo specifičnost pri 90% občutljivosti. Najslabšo vrednost AUC smo dobili pri določevanju deleža prostega PSA.

Tumorski označevalec PSA je tako med vsemi štirimi označevalci, katere smo obravnavali v naši raziskavi, pokazal največjo diagnostično uporabnost in najvišjo specifičnost ter občutljivost.

6 LITERATURA

1. Kmetec A: Benigna hiperplazija prostate. Farmacevtski vestnik. 2011; 62: 77-80.
2. <http://www.mf.un-ilj.si/dokumenti/6aa80b1480c795246bd389573138590a.pdf>.
3. Ovčak Z: Vloga patologa pri diagnostiki karcinoma prostate. Radiology and oncology. 2009; 40 (Suppl 1): S115-S120.
4. Lee HC, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A: Overview of prostate anatomy, histology and pathology. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2011; 40:565-575.
5. Hammerich KH, Ayala GE, Wheeler TM: Prostate cancer. Cambridge University Press, Cambridge. 2008: 1-9.
6. <http://www.urology-textbook.com/prostate-anatomy.html>.
7. Marks LS, Roehrborn CG, Andriole GL: Prevention of benign hyperplasia disease. The Journal of Urology. 2006;176:1299-1306.
8. Židanik S: Obravnava bolnikov z benigno hiperplazijo prostate pri zdravnikih splošne medicine. Zdravniški vestnik. 2003; 72: 411-415.
9. Bratuš D, Kolenc A, Hlebič G: Naše izkušnje z zdravljenjem omejenega karcinoma prostate z radikalno retropubično prostatektomijo. Zdravniški vestnik. 2003; 72: Suppl. 1: 65-66.
10. O'Leary MP: Validity of the "Bother Score" in the Evaluation and Treatment of Symptomatic Benign Prostatic Hyperplasia. Reviews in Urology. 2005; 7(1):1-10.

11. Barry MD, Avins AL, Meleth S.: Performance of the American urological association symptom index with and without an additional urge incontinence item. *Urology*. 2011; 78(3):550-55.
12. McVary KT, Roehrborn CG, Avins AL, Barry MJ, Bruskewitz RC, Donnell RF, Foster HE, Gonzalez CM, Kaplan SA, Penson DF, Ulchaker JC, Wei JT: Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology*. 2011; 185 (5): 1793-803.
13. http://gsk.si/uploads/_custom/Avodart_brosura4finalpdf.pdf.
14. Chen Z, Chen H, Stamey AT: Prostate specific antigen in benign prostatic hyperplasia: Purification and characterization. *The journal of urology*. 1997; 157: 2166-2170.
15. Eischler K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachmann ML, Kleijnen J: Diagnostic value of systematic biopsy Methods in the investigation of prostate cancer: A systematic review. *The journal of urology*. 2006; 175 (5): 1605-10.
16. Mašera A, Ovčak Z: Patologija sečnih poti in moškega spolovila. *Medicinski razgledi*, Ljubljana. 1981; 100-130.
17. Roberts RO, Lieber MM, Bostwick DG, Jacobsen SJ: A review of clinical and pathological prostatitis syndromes. *Urology*. 1997; 49(6): 809-821.
18. Krieger JN, Nyberg L, Nickel JC: A new era in prostatitis research begins. *Journal of the American medical association*. 1999; 282: 236-237.
19. Bren A, Lindić J: *Interna medicina*, DZS Ljubljana, Ljubljana. 2000; 759-760.
20. Delongchamps NB, de la Roza G, Chandan V, Jones R, Sunheimer R, Threutte G, Jumbelic M, Haas GP: Evaluation of prostatitis in autopsied prostates-Is Chronic inflammation more associated with benign prostatic hyperplasia or cancer?. *The*

- Journal of Urology. 2008;179:1736-1740.
21. Onkološki inštitut Ljubljana: Rak v Sloveniji 2008. Register raka Republike Slovenije .2011;35-42.
 22. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.
 23. Kirn-Pompe V, Žakelj-Primic M: Ali vemo, koliko je raka prostate v Sloveniji in kaj vpliva na razvoj te bolezni?. Onkologija 2006;10 (1): 9-13.
 24. Catalona JW, Bartsch G, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ, Amirkhan A, Horninger W, Klocker H, Mikolajczyk SD: Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4 ng/ml. The Journal of Urology. 2003; 170: 2181-2185.
 25. 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; 73:481-484.Sobin LH: TNM Principles, history, and relation to other prognostic factors. Cancer Supplement 2001;91 (8): 1589-1592.
 26. Sobin LH: TNM Principles, history and relation to other prognostic factors. Cancer Supplement 2001;91 (8):1589-1592.
 27. Kmetec A: Nadzorovano opazovanje (Watchful waiting) kot možna oblika zdravljenja raka prostate. Onkologija. 2006;10(2): 125-127.
 28. Oblak C: Zgodnje odkrivanje, zdravljenje in spremljanje bolnikov z rakom prostate. Radiology and Oncology. 2006; 40 (Suppl 1): S127-S136.
 29. Clements R: Ultrasound of prostate cancer. European Radiology. 2001;11: 2119-2125.

30. Egevad L, Alsbrook WC, Epstein JI: Current practice of Gleason grading among genitourinary pathologists. *Human pathology*. 2004;36: 5-9.
31. Shah RB: Current perspective on the Gleason grading of prostate cancer. *Archive of pathology and laboratory medicine*. 2009;113: 1810-1816.
32. Humphrey PA: Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern pathology*. 2004; 17: 292-306.
33. Kundra V, Silverman PM, Matin SF, 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(4):830-44.
34. Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, Evans CL, Linton HJ, Horfing W, Klocker H, Mikolajczyk SD: Serum pro-prostate specific antigen prefferentially detects aggressive prostate cancers in men with 2 to 4 ng/ml prostate specific antigen. *The journal of urology*. 2004;171: 2239-2244.
35. Šamija M, Orešić V, Solarić M: Rak prostate. *Medicinska naklada Zagreb, Zagreb*. 2002:9-18.
36. Oblak C: Prostatični specifični antigen. *Onkologija*. 2006; 10(1): 37-40.
37. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F: EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Treatment of Clinically Localised Disease. *European Urology*. 2010;61-71.
38. Lee F, Torp-Pederson S, Littrup PJ, McLeary RD, McHugh TA, Smid AP, Stella PJ, Borlaza GS: Hypoechoic lesions of the prostate: clinical relevance of tumor size, digital rectal examination, and prostate-specific antigen. *Radiology*. 1990. 170: 29-32.

39. Damiano R, Autorino R, Perdon S, De Sio M, Oliva A, Esposito C, Cantiello F, Di Lorenzo G, Sacco R, Armiento M: Are extended biopsies really necessary to improve prostate cancer detection? Prostate cancer and prostatic diseases. 2003;6:250-255.
40. Carvahl GH, Smith SD, Douglas EM, Ramos C, Catalona JW: Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/ml or less. The Journal of Urology. 1999; 161:835-839.
41. Clements R: Has ultrasonography a role in screening for prostatic cancer? European Radiology. 1997; 7:217-223.
42. Eble J, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA: Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. IARC Press, Lyon. 2004: 159-170.
43. Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične biokemije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. Ljubljana. 2008:91-104.
44. Bhatt NA, Mathur R, Farooq A, Verma A: Cancer biomarkers: Current perspectives. Indian journal of medicine research. 2010;132: 129-135.
45. Borštnar S, Ovčariček T, Zakotnik B: Pomen tumorskih označevalcev pri bolnikih s solidnimi tumorji in limfomi. Onkologija. 2010; 14(1): 49-51.
46. Shariat FS, Scardino PT, Lija H.: Screening for prostate cancer: An update. The Canadian journal of urology. 2009; 15(6): 4363-4374.
47. Mikolajczyk SD, Catalona WJ, Evans CL, Linton HJ, Millar LS, Marker KM, Katir D, Amirkhan A, Rittenhouse HG: Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. Clinical chemistry. 2004;50(6): 1017-1025.

48. Tosoian J, Loeb S: PSA and beyond: The past, present and future of investigative biomarkers for prostate cancer. *The scientific world journal*. 2010;10:1919-1931.
49. Novaković S: Tumorski označevalci v klinični onkologiji. Onkološki inštitut Ljubljana. Ljubljana. 2000; 7-15.
50. Ezenwa EV, Tijani KH, Jeje EA, Soriyan OA, Ogunjimi MA, Ojewola RW, Ajie OI, El-Nahas AR: The value of percentage free prostate specific antigen (PSA) in the detection of prostate cancer among patients with intermediate levels of PSA (4.0-10.0 ng/ml) in Nigeria. *Arab journal of urology*. 2012; 10(4): 394-402.
51. Lujan M, Paez A, Llanes L, Miravalles E, Berenguer A: Prostate specific antigen density. Is there a role for this parameter when screening for prostate cancer?. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2001;4: 146-149.
52. Kundu SD, Roehl KA, Yu X, Antenor JAV, Suarez BK, Catalona WJ: Prostate specific antigen density correlates with features of prostate cancer aggressiveness. *The journal of urology*. 2007; 177: 505-509.
53. Stephan C, Stroebe G, Heinau M, Lenz A, Roemer A, Lein M, Schnorr D, Loening SA, 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. *American Cancer Society*. 2005; 104(5): 993-1003.
54. Kalish J, Cooner WH, Graham SD: Serum PSA adjusted for volume of transition zone (PSAT) is more accurate than PSA adjusted for total gland volume (PSAD) in detecting adenocarcinoma of the prostate. *Urology*. 1994;43: 601.
55. Riffenburgh RH, Amling CL: Use of early PSA velocity to predict eventual abnormal PSA values in men at risk for prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2003;6: 39-44.

56. Ng KM, van As N, Thomas K, Amissah-Woode R, Horwich A, Huddart R, Khoo V, Thompson A, Dearnaley D, Parker C: Prostate-specific antigen (PSA) kinetics in untreated, localized prostate cancer: PSA velocity vs PSA doubling time. *Journal of British association of urological surgeons*. 2008;103: 872-876.
57. Le VB, Griffin RC, Loeb S, Carvalhal FG, Kan D, Baumann NA, Catalona J: [-2]Proenzyme prostate specific antigen is more accurate than total and free prostate specific antigen in differentiating prostate cancer from benign disease in a prospective prostate cancer screening study. *The journal of urology*. 2009; 183: 1355-1359.
58. Makarov DV, Isharwal S, Sokoll LJ, Landis P, Marlow C, Epstein JI, Partin AW, Carter Ballentine H, Veltri WR: proPSA Measurements in Serum and Tissue are Associated with Treatment Necessity Among Men Enrolled in Expectant Management for Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15(23): 7316-7321.
59. Isharwal S, Makarov VD, Sokoll LJ, Landis P, Marlow C, Epstein JI, Partin AW, Carter HB., Veltri RW: ProPSA and diagnostic biopsy tissue DNA content combination improves accuracy to predict need for prostate cancer treatment among men enrolled in an active surveillance program. 2011;77 (3): 736e1-763e6.
60. Sokoll LJ, Wang Y, Feng Z, Kagan J, Partin AW, Sanda GM, Thompson IM, Chan DV: [-2]Proenzyme Prostate Specific Antigen for Prostate Cancer Detection: A National Cancer Institute Early Detection Research Network Validation Study. *The Journal of Urology*. 2008; 180: 539-543.
61. <http://www.cancer.gov/ncicancerbulletin/071012/page8>.
62. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH et al: A multicenter study of [-2]Pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *The Journal of Urology*. 2011;

185: 1650–1655.

63. Faye S, Stearman M: Prostate cancer risk assessment: The role of the Prostate health index. *The Biomedical Scientist*. 2011: 708-710.
64. Beckman Coulter Inc: Access 2 Immunoassay systems Operators`s Guide. USA, 2007.
65. Beckman Coulter: Access 2 Immunoassay systems p2PSA. USA 2009.
66. Adamič Š: Temelji biostatistike, 2.izdaja, Medicinska fakulteta univerze v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko. Ljubljana, 1989: 20-50.
67. http://www.preseren.it/matematika/statistika/opisna_statistika.pdf:
http://en.wikipedia.org/wiki/Shapiro%E2%80%93Wilk_test.
68. <http://www.educa.fmf.uni-lj.si/izodel/sola/2000/ura/kacic/pop-matematika.html>
69. <http://teorionline.files.wordpress.com/2010/03/the-mann-whitney-u-test.pdf>.
70. http://en.wikipedia.org/wiki/Reference_range.
71. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/12/UPLB-Biomedicinska_informatika/5._vaja_-_predstavitev.pdf.
72. <http://www.kcl.ac.uk/iop/depts/biostatistics/teaching/previouslecturenotes/developingmeasurementscales/lecture5.pdf>.
73. <http://medind.nic.in/ibv/t11/i4/ibvt11i4p277.pdf>

DODATEK 1

Preglednica XXX: Skupina 1: Osebe, katerim so po biopsiji določili BHP, vnetje, atrofijo, HGPIN. Zbrane so le meritve, katerih koncentracije PSA spadajo v diagnostično »sivo cono«.

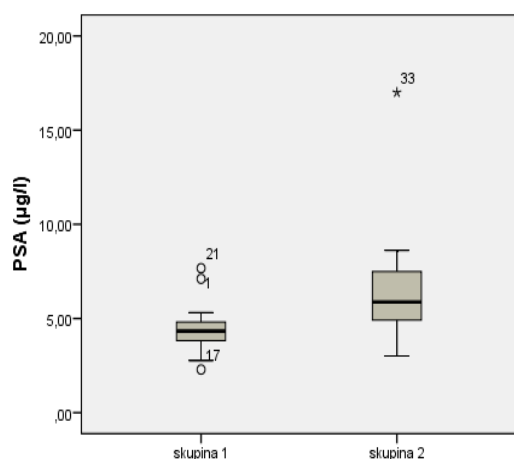
Zaporedna številka	Datum rojstva	Datum odvzema vzorca	Celotni PSA [$\mu\text{g/l}$]	Prosti PSA [%]	[-2] proPSA [ng/l]	phi
1.	6.8.1956	6.12.2011	7,67	12,65	1,88	5,37
2.	10.1.1942	22.9.2009	4,39	9,57	1,05	5,21
3.	1.5.1943	6.12.2011	3,02	22,52	0,07	0,18
4.	10.8.1950	14.2.2012	4,33	12,47	1,09	4,19
5.	22.4.1944	19.12.2011	4,68	16,45	0,67	1,89
6.	26.4.1947	14.2.2012	3,82	18,85	0,01	0,03
7.	14.9.1958	2.12.2011	2,92	11,30	0,83	4,32
8.	22.4.1946	5.1.2012	4,38	19,63	2,38	5,79
9.	4.9.1937	21.1.2010	4,8	20,42	0,81	1,80
10.	29.8.1946	23.3.2010	4,84	12,60	0,29	1,05
11.	2.1.1945	6.12.2011	4,08	36,27	1,07	1,46
12.	29.7.1937	12.1.2009	2,77	12,64	0,63	3,01
13.	5.11.1947	6.12.2011	4,15	19,52	0,05	0,14
14.	27.5.1942	19.1.2010	4,81	21,83	4,31	9,01
15.	8.3.1953	9.2.2012	5,08	16,73	0,03	0,09
16.	18.9.1946	16.12.2011	3,13	19,81	0,01	0,03
17.	28.9.1944	15.12.2011	2,29	37,99	1,32	2,30

18.	4.7.1942	19.12.2011	3,9	22,31	0,01	0,02
19.	15.4.1951	13.12.2011	5,31	11,30	1,53	5,87
20.	15.5.1955	13.12.2011	4,09	22,74	0,33	0,72
21	14.3.1941	13.12.2011	7,11	9,85	0,05	0,20

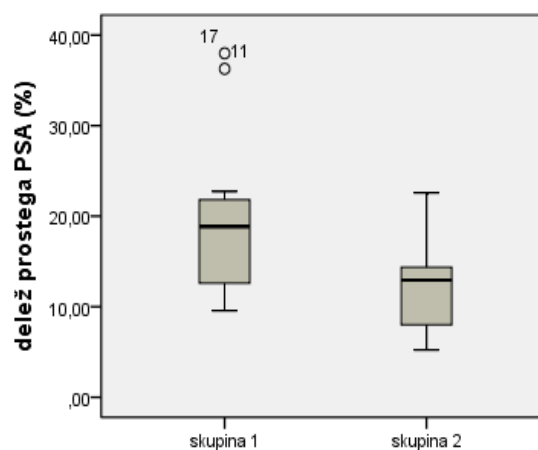
Preglednica XXXI: Skupina 2: Osebe, katerim so po biopsiji določili karcinom prostate.
Zbrane so le meritve, katerih koncentracije PSA spadajo v diagnostično »sivo cono«

Zaporedna številka	Datum rojstva	Datum odvzema vzorca	Celotni PSA [µg/l]	Prosti PSA [%]	[-2] proPSA [ng/l]	Phi
1.	8.4.1934	12.12.2011	7,01	20,11	1,31	2,46
2.	12.2.1935	18.1.2010	3,21	9,03	2,80	17,30
3.	5.7.1956	20.1.2012	5,53	7,41	0,01	0,06
4.	19.7.1942	17.11.2009	5,57	8,62	2,56	12,60
5.	6.9.1928	12.1.2009	5,22	14,56	0,17	0,51
6.	28.10.1949	12.1.2009	3,01	22,59	0,90	2,3
7.	21.12.1941	1.4.2010	6,47	10,97	2,01	7,19
8.	14.7.1936	8.3.2010	5,34	13,11	4,20	13,85
9.	10.7.1949	13.2.2012	6,81	6,61	0,01	0,06
10.	20.7.1942	14.2.2012	7,98	12,78	0,58	1,59
11.	26.7.1930	9.2.2012	8,62	9,28	0,11	0,41
12.	11.7.1951	19.12.2011	17	14,18	4,94	8,45
13.	13.3.1960	13.2.2012	8,5	17,53	0,04	0,07
14.	28.1.1951	6.12.2011	3,33	7,21	0,13	0,98
15.	15.4.1954	8.12.2011	4,6	13,70	0,88	3,01

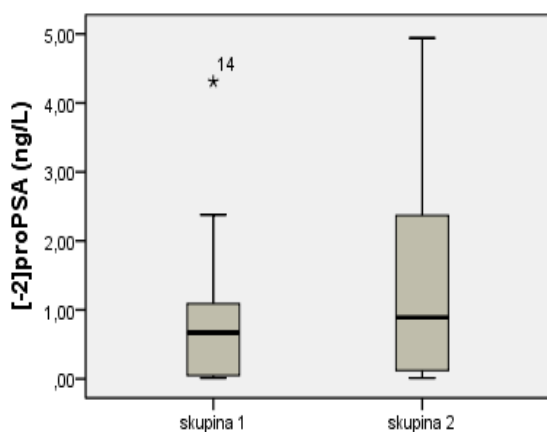
16.	1.1.1953	19.12.2012	4,36	20,18	2,18	5,18
17.	12.2.1946	1.12.2011	6,89	5,22	1,30	9,49
18.	9.5.1944	14.2.2012	5,49	13,84	0,01	0,03
19.	11.1.1942	5.1.2012	8,54	6,56	3,77	19,67
20.	8.3.1946	8.12.2011	6,17	13,29	0,38	1,15



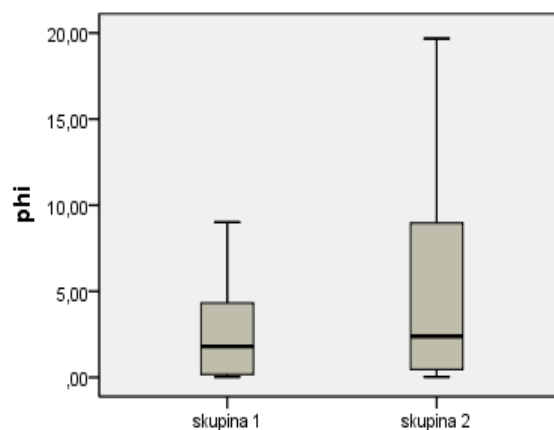
Slika 32: Kvartilni diagram meritev PSA za skupino 1 in skupino 2.



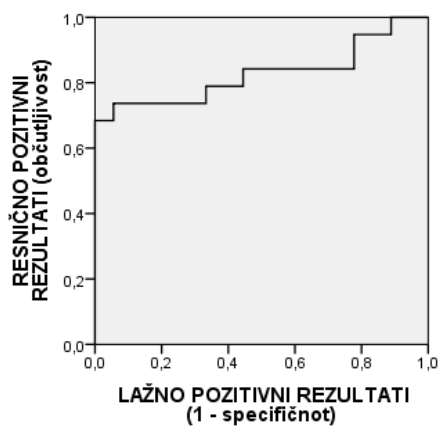
Slika 33: Kvartilni diagram za skupino 1 in skupino 2.



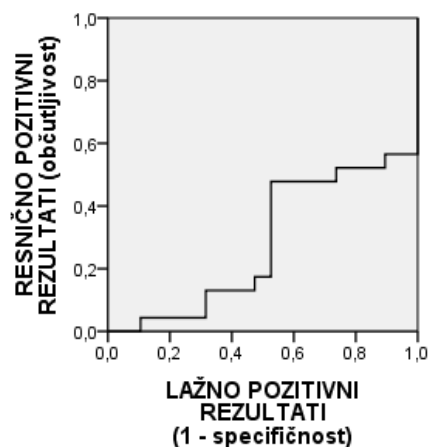
Slika 34: Kvartilni diagram meritev koncentracij tumorskega označevalca [-2]proPSA .



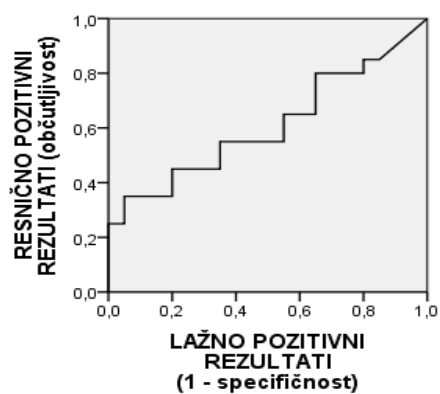
Slika 35: Kvartilni diagram vrednosti phi za skupino 1 in skupino 2.



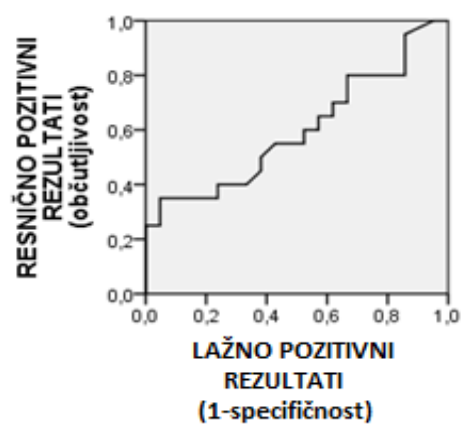
Slika 36: Krivulja ROC za tumorski označevalec PSA.



Slika 37: Krivulja ROC za delež prostega PSA



Slika 38: Krivulja ROC za tumorski označevalec [-2]proPSA.



Slika 39: Krivulja ROC za phi.