

ULOGA PROSTATIČNOG SPECIFIČNOG ANTIGENA U RANOJ DIJAGNOZI KARCINOMA PROSTATE

Nataša Lalić¹, Miodrag Ćimović², Nada Majkić-Singh¹, Sava Mičić²

¹Institut za medicinsku biohemiju

²Institut za urologiju i nefrologiju, Klinički centar Srbije, Beograd

Cljučne reči: Prostatični specifični antigen (PSA) spada u najznačajnije tumorske markere koji se koriste u ranom otkrivanju karcinoma prostate, određivanju stadijuma bolesti, kao i praćenju učinka terapije kod muškaraca sa karcinomom prostate. Standardizacija metoda za određivanje PSA komplikuje se pojavom PSA u serumu u obliku više izoformi od kojih su najznačajnije forme slobodnog PSA, PSA vezanog za alfa-1-antihimotripsin, koje imaju antigene determinante za koje se vezuju različita antitela, kao i PSA vezan za alfa-2-makroglobulin, koji nema antigene determinante, tako da se ova izoforma PSA ne može odrediti pomoću imunoloških postupaka. Postoji veliki broj imunoloških metoda za određivanje PSA, koje se međusobno razlikuju po antitelima koja se koriste, po obeleživaču, standardima i po vrednostima PSA koje se dobijaju. Da bi se dizajnirao dobar imunološki test neophodno je standardizovati kalibratore i odabrati odgovarajuća antitela, pri čemu se mora voditi računa o ostalim karakteristikama testa kao npr. osobini čvrste faze, kinetici reakcije itd. Pošto se nalazi u adenomatoznom, normalnom i kancerogenom tkivu prostate, dijagnostički značaj PSA je ograničen usled preklapanja rezultata kod pacijenata sa karcinomom i benignom hiperplazijom prostate (BPH). Ovo je naročito izraženo za vrednosti PSA koje se nalaze u tzv. »sivoj zoni«, i to između 4,0 i 10,0 ng/mL PSA. Da bi se povećala specifičnost za dijagnostiku karcinoma prostate primenjuju se derivati PSA kao što su: gustina PSA (*PSA density*) dinamika rasta PSA (*PSA velocity*), PSA vrednosti korigovane godinama starosti, određivanje slobodnog (sl PSA) i kompleksiranog molekula PSA (cPSA) i njihovog odnosa sa ukupnim PSA.

Cljučne reči: PSA, PSA density, PSA velocity, PSA vrednosti korigovane godinama starosti, slobodni (sl PSA) i kompleksirani PSA (cPSA)

Uvod

Karcinom prostate je vrlo značajan uzrok smrtnosti kod muškaraca. Poređenjem rezultata dobijenih poslednjih dvadesetak godina prošlog veka uočen je porast smrtnosti izazvan karcinomom prostate za 37%, a stopa otkrivanja karcinoma je porasla za 90% (1). Razlog za ovakav skok učestalosti je prirodno starenje muške populacije kao i primena testa PSA za rano otkrivanje karcinoma u okviru raznih skrining programa.

Prostatični specifični antigen (PSA) spada u najznačajnije tumorske markere koji se koriste u ranom otkrivanju bolesti, utvrđivanju stadijuma bolesti, kao i praćenju učinka terapije kod muškaraca sa karcinomom prostate. PSA se može smatrati tumorskim mar-

kerom specifičnim za prostatu. Kako ga produkuju i maligne i nemaligne ćelije prostate ne može se smatrati markerom za karcinom. Zbog toga što se nalazi u adenomatoznom, normalnom i kancerogenom tkivu prostate dijagnostički značaj PSA je ograničen preklapanjem rezultata PSA kod pacijenata sa karcinomom i benignom hiperplazijom prostate (BPH). Ovo je naročito izraženo za vrednosti PSA koje se nalaze u tzv. »sivoj zoni« između 4,0 i 10,0 ng/mL PSA. Da bi se povećala specifičnost u dijagnostici karcinoma prostate uvedeni su i derivati PSA kao što su: gustina PSA (*PSA density*), dinamika rasta PSA (*PSA velocity*), PSA vrednosti korigovane godinama starosti, kao i određivanje slobodnog (sl PSA) i kompleksiranog molekula PSA (cPSA) i njihovog odnosa sa ukupnim PSA.

PSA se nalazi i u drugim organima (npr. znojnim i parauretralnim žlezdama, dojci, endometriju), kao i drugim neprostatičnim tumorima npr. tumorima dojke i pljuvačnih žlezda (2) i tečnostima mleku (3) i u amnionskoj tečnosti (4).

Adresa autora

Nataša Lalić
Institut za medicinsku biohemiju,
Klinički centar Srbije, Višegradska 26, 11000 Beograd

Molekulske forme PSA

PSA se u serumu muškaraca nalazi u više molekularnih formi. Gen za PSA je smešten na 19q hromozomu i 80% je homolog sa genom za kalikrein (PSA je poznat i kao humani kalikrein hK3). Sadrži 5 egzona i 4 introna (5). PSA je proteinaza sa molekularnom masom oko 30 kDa (6). Molekul PSA sadrži oko 92% peptida i oko 8% ugljenih hidrata. PSA postoji u najmanje 5 izoformi sa izoelektričnom tačkom (pI) između 6,8 i 7,5. Razlika koja se javlja među izomerima potiče od različitog sadržaja sijalinske kiseline (7). Kao i većina proteaza molekul PSA je u najvećoj meri vezan za endogene inhibitore proteaza (8). Glavni inhibitor je alfa-1-antihimotripsin (ACT). Manje količine molekula PSA su vezane za inhibitore alfa-1-proteinaza inhibitore, alfa-2-makroglobuline i alfa-tripsin inhibitor. Male količine PSA se nalaze u slobodnoj, nevezanoj formi.

Tabela I. Molekulske forme PSA u serumu

Molekulske forme	Apr. mol. masa (kDa)	% od ukupnog PSA
Slobodan PSA	30	10 40
PSA-alfa-1-antihimotripsin (PSA-ACT)	100	60 90
PSA-alfa-1-proteinaza inhibitor	190	< 1
PSA alfa-2-makroglobulin	800	< 0,1
PSA-inter-alfa-tripsin inhibitor	250	< 0,1

Biološka funkcija PSA

PSA katalizuje hidrolizu brojnih proteinskih supstrata. Fiziološki, glavna uloga PSA je likvefakcija semenog koagulumuma (9). PSA deluje i na druge supstrate, kao npr. na protein vezan za faktor rasta sličan insulinu IGFBP-3 (insuline-like growth factor binding protein-3). IGFBP-3 je jedan od brojnih serumskih proteina vezanih za faktor rasta sličan insulinu (insuline-like growth factor IGF I i II). IGF je faktor rasta za razne ćelije. Tako hidroliza IGFBP-3 nastala pod dejstvom PSA može da promeni vrednosti IGF i na taj način preusmeri ćelijsku proliferaciju (10). Takođe je poznata uloga PSA u katalitičkoj degradaciji ekstracelularnih matriks proteina fibronektina i laminina (11). Inhibicija proteolitičke aktivnosti PSA pomoću antitela za proteaze rezultira smanjenjem invazije na bazalnu membranu ćelija karcinoma. Ovi nalazi ukazuju da PSA kao i njoj slične proteaze imaju značajnu ulogu u invaziji karcinoma i pojavi metastaza.

Određivanje PSA

Pomoću komercijalnih imuno testova za određivanje PSA određuju se obe najzastupljenije forme PSA molekula: kompleksiran PSA-ACT i slobodan PSA

(12). Zbir obe frakcije označava se kao ukupan PSA. Kompleks PSA-ACT, kao i molekula slobodnog PSA imaju antigene determinante koje omogućavaju da se PSA odredi imunološkim metodama (13,14). Molekul PSA vezana za alfa-2-makroglobulin nema antigene determinante, tako da se ova izoforma PSA ne može odrediti pomoću imunoloških postupaka. Postoji veliki broj imunoloških metoda za određivanje PSA, koje se međusobno razlikuju po antitelima koja se koriste, po obeleživaču, standardima i po vrednostima PSA koje se dobijaju. Da bi se dizajnirao dobar imunološki test neophodno je standardizovati kalibratore i odabrati odgovarajuća antitela, pri čemu se mora voditi računa o ostalim karakteristikama testa kao npr. osobini čvrste faze, kinetici reakcije itd. (15). Međutim kod različitih metoda za određivanje PSA nađene su velike varijacije u rezultatima zbog korišćenja različitih antitela, kinetike reakcije ili primene različitih standarda.

Selektivnost imunotesta zavisi od specifičnosti antitela koja se koriste. U komercijalnim testovima koriste se monoklonsko-monoklonska antitela (npr. Hybritech immunoassay sistem) ili monoklonsko-poliklonska antitela (Abbott IMx). Koristi se kombinacija antitela koja treba da prepozna slobodni i vezani PSA u odnosu u kome se nalazi u serumu. Za obeležavanje se koriste radioizotopi (RIA), enzimi (EIA), fluoro jedinjenja (Delfia) ili luminiscentne komponente.

Kinetika reakcija takođe utiče na tačnost određivanja PSA. Ukoliko se vreme inkubacije skraćuje, prednost u vezivanju za monoklonska antitela će imati slobodan PSA u odnosu na kompleks PSA-ACT. I druge karakteristike testova kao što su temperatura i pH mogu da izazovu sličan efekat (15).

Drugi važan momenat za pravilno izvođenje imunotesta je izrada kvalitetnih standarda. Kao matriks za pravljenje standarda najčešće se koristi humani serum u koji se dodaje prečišćeni (hromatografijom i propuštanjem kroz kolone sefadexa) PSA. Pri tome se mora naročito voditi računa da se inaktivira alfa-2-makroglobulin za koji PSA u *in vitro* uslovima ima veći afinitet, jer se tako vezani PSA ne može odrediti pomoću imunoloških metoda. U tom slučaju bi se dobile lažno visoke vrednosti standarda a samim tim i određeni PSA u serumu. Američki nacionalni komitet za standarde u kliničkoj hemiji (NCCLS) je predložio upotrebu standarda koji bi predstavljali mešavinu slobodnog i vezanog PSA u odnosu u kom se nalazi i u serumu obolelih od karcinoma prostate. U decembru 1995. godine predložena su tri standarda: standard koji sadrži 100% slobodan PSA, ili 100% PSA-ACT i standard koji sadrži kombinaciju od 90% PSA-ACT i 10% slobodnog PSA (16).

Thomas Stamey i tim Stanford univerziteta su predložili pripremu prečišćenog standarda PSA (koji sadrži 90% PSA-ACT i 10% slobodnog PSA) po metodi Sensabaugh i Blake (17). Po preporuci ove grupe da bi standard bio dobar mora da zadovolji sledeće kriterijume:

1. Standard treba da sadrži slobodni i vezani PSA u odnosu kao u serumu,
2. Koeficijent varijacije za preciznost za takav standard meren iz dana u dan treba da bude manji od 12%, a meren u jednom danu treba da bude manji od 8%,
3. Analitički detekcioni limit za standard označen kao »nula« mora da bude manji od 0,2 ng/mL,
4. Diluciona linearnost treba da bude manja od 3% za uzorke razblažene 10 100 puta i
5. Korelacija sa referentnom metodom treba da bude 0,95 za raspon od 2 20 ng/mL.

Referentne vrednosti

Konsenzusom usvojena granična referentna vrednost za PSA je 4,0 ng/mL. Međutim, mnogi autori navode značajan procenat otkrivenih karcinoma među pacijentima sa vrednostima PSA < 4,0 ng/mL. Zbog toga je ova granična vrednost bila predmet preispitivanja. Prema nalazima multicentrične višegodišnje studije od strane Craforda (45) sa Kolorado univerziteta i grupe saradnika sa Floride na kongresu urologa u maju 2002. god, a na osnovu nalaza urađenih kod 27 863 osobe starosti od 50 do 75 godina dat je predlog da se vrednost PSA od 2,6 ng/mL usvoji kao granična. Istovremeno je predložena i strategija skrininga na osnovu baznih vrednosti PSA. Ukoliko je PSA manji od 1,0 ng/mL u 98,6% slučajeva će se normalne vrednosti PSA zadržati i u narednih 4 godine. Kod vrednosti između 1,0 i 2,0 ng/mL 98,8% osoba će imati negativan nalaz sledećih 2 godine. Zbog toga se preporučuje da se skrining radi svakih 5 godina kod osoba sa vrednostima PSA manjim od 1,0 ng/mL, ako su vrednosti PSA između 1,0 i 2,0 ng/mL svake dve godine, a ako su vrednosti PSA između 2,0 i 4,0 ng/mL svake godine (45).

Čuvanje uzoraka

Pri određivanju PSA u serumu pacijenata treba imati na umu faktore koji mogu uticati na krajnji rezultat određivanja. Tu spadaju preanalitičke, analitičke i biološke varijacije PSA u uzorku pacijenta. Analitičke varijacije uključuju analitičku nepreciznost izazvanu primenom različitih reagenasa i procedura. Preanalitičke varijacije mogu da potiču od varijacija nastalih pre vadenja krvi pacijenta ili od čuvanja uzorka.

Varijacije koncentracija PSA u serumu mogu da potiču i od godina, rase, sezonskih razlika. Ove razlike treba uzimati u obzir pri praćenju vrednosti PSA kod pacijenata. PSA vrednosti se menjaju sa godinama starosti, sa tendencijom povećanja naročito između šeste i sedme decenije života. Zbog toga se referentne vrednosti korigovane godinama starosti mogu pimenjivati u dijagnozi karcinoma prostate naročito kod osoba starijih od 60 godina (18). Evidentirana je razli-

ka u PSA vrednostima koja potiče od različitosti rasa. Američki afrikanci generalno imaju više vrednosti od belih muškaraca (19). Takođe je primećeno da postoje i sezonske varijacije PSA prema kojim se vrednosti PSA povećavaju u proleće (20). Različite dijagnostičke procedure takođe mogu da budu uzrok razlike u vrednostima PSA. Na vrednosti PSA utiču i manipulacije sa prostatom kao što su masaža prostate pri rektalnom pregledu, kojom se vrednosti PSA mogu povećati i do dva puta, i biopsija prostate ili druge hirurške intervencije na prostati koje mogu povećati vrednost PSA i do 60 puta u odnosu na baznu vrednost PSA. Ejakulacija može takođe da dovede do povećanja vrednosti PSA što je potvrđeno u više radova, pri čemu se preporučuje da se pre određivanja PSA apstinira najmanje 24 sata (21, 22). Na vrednosti PSA može da se odrazi i interakcija alfa-2-makroglobulina i PSA, gde visoke koncentracije alfa-2-makroglobulina mogu da maskiraju povišene koncentracije PSA i tako daju lažno niže vrednosti PSA. Honda i sar. (23) su našli da je alfa-2-makroglobulin *in vivo* u negativnoj korelaciji sa PSA. Ovakva korelacija ukazuje na mogućnost da pacijenti sa visokim vrednostima alfa-2-makroglobulina mogu imati lažno niske vrednosti PSA.

Pravilno uzimanje i čuvanje uzorka za određivanje PSA je od velike važnosti, posebno za određivanje slobodne frakcije PSA. Pokazano je da se oko 1% slobodnog PSA gubi po satu ukoliko serum nije odvojen od koagulumata. Takođe se oko 3% slobodnog PSA gubi na dan ukoliko se serum čuva na sobnoj temperaturi, 0,4% mesečno ako se čuva na 20 °C a 0,4% mesečno ako se čuva na 70 °C. Može se smatrati prihvatljivim čuvanje seruma za određivanje slobodnog i ukupnog PSA u frižideru do 24^h, a ukoliko se čuva duže serum se mora zamrznuti na 70 °C (24).

Dijagnostički značaj

PSA je bez sumnje najznačajniji tumorski marker za rano otkrivanje karcinoma prostate. Međutim uprkos visokoj osetljivosti, vrednost PSA testa je limitirana značajno niskom specifičnošću. Iz ovog razloga čini se veliki broj nepotrebnih biopsija kod pacijenata sa povišenim vrednostima PSA usled adenoma prostate. U cilju poboljšanja specifičnosti PSA uvedeni su derivati PSA u dijagnostiku i to: određivanje gustine PSA (PSA density), dinamike rasta PSA (PSA velocity), PSA referentne vrednosti u zavisnosti od godina starosti, kao i posebni testovi za određivanje slobodnog i kompleksiranog PSA (PSA vezanog za alfa-1-antihimotripsin).

Gustina PSA – PSAD (PSA density) se dobija deljenjem vrednosti PSA sa volumenom prostate (određenim pomoću ultrazvuka). Ova metoda se zasniva na činjenici da gram malignog tkiva sintetiše veću količinu PSA (3 5 ng/mL/mL tkiva) od BPH (0,3 ng/mL/mL tkiva) (25). Postoji razlika između volumena prostate kod BPH i kod karcinoma. Zbog toga su i

vrednosti PSAD značajno veće kod karcinoma u odnosu na adenom prostate (0,47 prema 0,10) (26).

Na predlog Seaman-a (27), PSAD se kao parametar za poboljšanje kliničkog značaja PSA koristi kada su vrednosti PSA u »sivoj zoni« (4-10 ng/mL). On smatra da ukoliko pacijenti imaju vrednosti PSA u »sivoj zoni«, a rektalnim pregledom nije dokazan patološki nalaz i ukoliko je vrednost PSAD < 0,15 takav pacijent treba da se klinički prati tako što se u kraćim vremenskim intervalima prate vrednosti PSA i rektalnog pregleda. Ukoliko su vrednosti PSAD > 0,15 pacijent treba da bude podvrgnut inicijalnoj biopsiji, koja je zlatni standard u postavljanju dijagnoze karcinoma prostate.

Dinamika rasta PSA (PSA velocity)

Predstavlja praćenje vrednosti PSA kroz određeni vremenski period. Određuje se merenjem PSA najmanje tri puta u toku 1,5 godine. Ukoliko PSA raste više od 0,75 ng/mL za godinu dana nalaz se smatra suspektnim na karcinom prostate (28).

PSA referentne vrednosti korigovane godinama starosti

Oesterling i saradnici (29) su pokazali da se vrednosti PSA povećavaju sa svakom dekadom starosti kod muškaraca koji nisu imali karcinom. Našli su da referentna vrednost od 4 ng/mL može da se primeni kod osoba u šestoj deceniji života, a da kod starijih osoba ovu vrednost treba korigovati. Američka asocijacija urologa preporučuje da se skrining karcinoma prostate izvodi kod pacijenata starijih od 50 godina. Kako je dokazano da se vrednosti PSA menjaju sa godinama zbog promene zapremine prostate predloženo je da se zbog poboljšanja specifičnosti i osetljivosti PSA testa uspostave rangovi referentnih vrednosti koji su zavisni od godina starosti. Takođe je pokazano da promene PSA vrednosti zavise i od rase (u populaciji Japanaca promene pokazuju niže vrednosti nego kod belih američkih muškaraca). Zbog ovakvih rasnih razlika predloženo je da se korekcija referentnih vrednosti PSA godinama starosti odredi za svaku etničku grupu (30).

Tabela II. Referentne vrednosti PSA za starosno specifične grupe

STAROSNE GRUPE (godine)	N	REFERENTNI RANGVI PSA, ng/mL
do 49	15	0-0,2
50-59	42	0-2,5
60-69	115	0-3,2
70-79	69	0-4,0
70-79	17	0-4,2

Referentne vrednosti za starosno specifične grupe određene na populaciji u našoj zemlji pokazale su da nema značajnog porasta vrednosti PSA sa godinama starosti (31).

Određivanje molekula slobodnog i kompleksiranog PSA

Značaj PSA u otkrivanju karcinoma prostate je ograničen činjenicom da veliki broj pacijenata sa vrednostima PSA < 4,0 ng/mL ima karcinom, kao i da više od 25% pacijenata sa BPH ima vrednosti PSA > 4,0 ng/mL. Otkriće da se kod pacijenata sa karcinomom prostate i BPH, različite molekulske forme PSA nalaze u različitim koncentracijama bilo je od velikog značaja (32). Razlog za povećanje koncentracije kompleksirane forme PSA-ACT još nije sasvim razjašnjen, mada je dokazano da maligne ćelije za razliku od benignih, pored povećanog stvaranja PSA stvaraju u većoj meri i ACT, koji se kompleksira sa PSA i u PSA-ACT formi ulazi u cirkulaciju. Pored toga što stvaraju manju količinu ACT ćelije kod benigne hiperplazije obezbeđuju manje optimalne uslove za stvaranje kompleksa PSA-ACT što dovodi do toga da se veća količina slobodnog PSA nađe u cirkulaciji (33).

Odnos sl/uk PSA može da bude od pomoći u diferencijalnoj dijagnozi karcinoma prostate naročito kod pacijenata sa vrednostima PSA u »sivoj zoni« tako što popravljaju značajno specifičnost i osetljivost u odnosu na PSA. Različite vrednosti odnosa sl/uk PSA su predlagane kao vrednosti odluke (*cutoff*) na osnovu kojih se pacijenti svrstavaju u grupu obolelih ili zdravih. Ukoliko su vrednosti odnosa sl/uk PSA niže postoji mogućnost povećanja procenta neotkrivenih karcinoma (4,1% kod *cutoff* vrednosti od 0,25 do 67% kod *cutoff* vrednosti od 0,10) (34-36).

Test za određivanje kompleksiranog PSA (cPSA) uveden je 1998. godine (37). Prednost određivanja cPSA i odnosa c/uk PSA se još uvek ispituje. Više studija je pokazalo da određivanje cPSA predstavlja napredak u detekciji karcinoma u odnosu na određivanje slobodnog PSA i odnosa sl/uk PSA (38-41). Drugi autori su u svojim radovima došli do zaključka da su cPSA i odnos c/uk PSA manje specifični u odnosu na slobodni PSA i odnos sl/uk PSA (42-44).

U velikoj multicentričnoj studiji u Americi (34) u koju je bilo uključeno 354 pacijenta, testirana je dijagnostička tačnost PSA, cPSA, odnosa c/uk PSA, slobodnog PSA i odnosa sl/uk PSA. Autori su došli do zaključka da određivanje cPSA ne daje značajno poboljšanje specifičnosti u detekciji karcinoma prostate, a odnos sl/uk PSA ima veću specifičnost za otkrivanje karcinoma u »sivoj zoni« od odnosa c/uk PSA (površina ispod ROC krive za sl/uk PSA je bila 0,768 u odnosu na c/uk PSA koja je bila 0,722).

Literatura

1. Littrup PJ. Future benefits and effectiveness of prostate cancer screening. American Cancer Society. *Cancer* 1997; 80: 1864-70.
2. Graves HCB. Nonprostatic sources of prostate specific antigen. *Clin Chem* 1995; 41: 7-9.
3. Yu H, Diamandis EP. Prostate specific antigen in milk of lactating women. *Clin Chem* 1995; 41: 54-58.
4. Yu H, Diamandis EP. Prostate specific antigen immunoreactivity in amniotic fluid. *Clin Chem* 1995; 41: 204-210.
5. Peehl D. Prostate specific antigen, role and function. *Cancer* 1995; 75: 2021-6.
6. Huber PR, Mattarelli G, Strittmatter B, et al. In vivo and in vitro complex formation of prostate specific antigen with α_1 -anti-chymotrypsin. *Prostate* 1995; 27: 166-175.
7. Duffy MJ. PSA as a marker for prostate cancer: a critical review. *Ann Clin Biochem* 1996; 33: 511-9.
8. McCormac RT, Rittenhous HG, Finlay JA, et al. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein gene family: A new era. *Urology* 45: 729-74, 1995.
9. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostate fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 1985; 76: 1899-1903.
10. Cohen P, Graves H, Peehl DM, et al. Prostate specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1046-53.
11. Webber MM, Waghray A, Bells D. Prostate specific antigen, a serin protease, facilitates human prostate cancer cell invasion. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1089-94.
12. Denis LJ, Murphy GP, Schroder FH. Report on the consensus for prostate cancer. *Cancer* 1995; 75: 1187-207.
13. Espana F, Sanchez-Cuenca J, Estelles A. Quantitative immunoassay for complexes of prostate-specific antigen with α_2 -macroglobulin. *Clin Chem* 1996; 42: 545-50.
14. Lalić N, Majkić-Singh N, Obradović I, Mičić S, Hadži-Đokić J, Džamić Z, Aćimović M. Evaluation of three PSA methods in range of analytical and biological detection limit. *Biochemica Clinica* 1997; 21: 99.
15. Chan D, Sokoll L. Prostate specific antigen: update 1997. *JIFCC* 1997; 9: 120-6.
16. NCCLS. Purification and characterization of prostate specific antigen (PSA) and PSA complexed to α_1 -anti-chymotrypsin (PSA-ACT) for use as primary standards; Proposed guideline. NCCLS Document I/LA 19-P. Villanova, PA, NCCLS, 1994.
17. Sensabaugh GF, Blake ET. Seminal plasma protein p30: Simplified purification and evidence for identity with prostate specific antigen. *J Urol* 1990; 144: 1523-6.
18. Kirolos MM. Statistical review and analysis of the relationship between serum prostate specific antigen and age. *J Urol* 1997; 158: 143-5.
19. Boyce N. New PSA guidelines for African-Americans. *Clin Lab News* 1996; 22 (10): 18.
20. Simsek U, Kutlu S, Yavascaouglu I, Oktay B, Ozyrt M. Seasonal variation of prostatic acid phosphatase and prostatic specific antigen in patients without prostatic malignancy. *Eur Urol* 1992; 21 Suppl 1: 111-4.
21. Zisman A, Soffer Y, Siegel YI, Paz A, Linder A. Post ejaculation serum prostate specific antigen level. *Eur Urol* 1997; 32: 54-7.
22. Herchman JD, Smith DS, Catalona WJ. Effect of ejaculation on serum total and free prostate specific antigen concentration. *Urology* 1997; 50: 239-43.
23. Honda SAA, Goldstein AP, Morita T, Sugiyama C, Cody L. Prostate specific antigen concentrations in serum in acute illnesses. *Clin Chem* 1996; 42: 1785-88.
24. Piironen T, Pettersson K, Suonapaa M, Stenman UH, Oesterling JE, Lovgren T. In vitro stability of free prostate specific antigen (PSA) and prostate specific antigen (PSA) complexed to α_1 -antichymotrypsin in blood samples. *Urology* 1996; 48 Suppl 6A: 81-7.
25. Stamey, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987; 317: 909-16.
26. Lalić N, Majkić-Singh N, Mičić S, Džamić Z, Aćimović M, Bojanić N. Značaj prostata specifičnog antigena u otkrivanju i praćenju karcinoma prostata. *Jugoslav Med Biochem* 1998; 17: 175.
27. Seaman E, Whang M, Olsson C. PSA density (PSAD) In: Oesterling G. eds. *The urologic clinics of North America*, Philadelphia: Saunders, 1993: 575-9.
28. Vaughan ED, Schlegel P, Perlmutter A. *Clinician's manual on prostate specific antigen*. London: Sciance Press Ltd, 1999: 25.
29. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA. Serum prostate specific antigen in a community-based population of healthy men. *JAMA* 1993; 270: 860-4.
30. Oesterling JE, Mumanoto Y, Tsukamoto T, et al. Serum prostate specific antigen in a community-based population of healthy Japanese men: lowervalues than for similarly aged white men. *Br J Urol* 1995; 75: 347-53.
31. Lalić N, Majkić-Singh N, Mičić S, Milković B, Aćimović M. Značaj ukupnog i slobodnog prostatičnog specifičnog antigena u diferencijalnoj dijagnozi karcinoma prostata. *Arh farm* 2002; 3: 337-344.
32. Mitrunen K, Pettersson K, Piironen T, Bjork T, Lilja H, Jorgren T. Dual-labeled one-step immunoassay for si-

- multaneous measurement of free and total prostate specific antigen concentrations and ratios in serum. *Clin Chem* 1995; 41: 1115-20.
33. Chen Z, Chen H, Stamey TA. Prostate specific antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization. *J Urol* 1997; 157: 2166-70.
34. Okihara K, Cheli C, Partin A, et al. Comparative analysis of complexed prostate specific antigen, free prostate specific antigen and their ratio in detecting prostate cancer. *J Urol* 2002; 167: 2017-24.
35. Lalić N, Majkić-Singh N, Mičić S, Aćimović M, Bojanić N. Correlation of methods for determination of prostate specific antigen. *Jugoslav Med Biohem* 1998; 17: 81-86.
36. Lalić N, Mičić S, Aćimović M, Majkić-Singh N, Stojanović J. Use of free to total PSA ratio and prostate specific antigen density to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41 (Suppl): 510.
37. Alard WJ, Zhou Z, Yeung KK. Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate specific antigen in serum. *Clin Chem* 1998; 44: 1216.
38. Brawer MK, Meyer GE, Letran JL. Measurement of complexed PSA improves specificity for early detection of prostate cancer. *Urology* 1998; 52: 372.
39. Brawer MK, Cheli CD, Neaman IE. Complexed prostate specific antigen provided significant enhancement of specificity compared with total prostate specific antigen for detecting prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 1476.
40. Miller MC, O'Dowd GJ, Partin AW. Contemporary use of complexed PSA and circulated percent free PSA for early detection of prostate cancer: impact of changing disease demographics. *Urology* 2001; 57: 1105-9.
41. Mitchell ID, Croal BL, Dickie A. A prospective study to evaluate the role of complexed prostate specific antigen and free/total prostate specific antigen ratio for the diagnosis of prostate cancer. *J Urol* 2001; 165: 1549.
42. Jung K, Elgeti U, Lein M. Ratio of free or complexed prostate specific antigen to total PSA: which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? *Clin Chem* 2000; 46: 55.
43. Filella X, Alcover J, Molina R. Measurement of complexed PSA in the differential diagnosis between prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Prostate* 2000; 42: 181.
44. Stamey TA, Yemoto CE. Examination of the 3 molecular forms of serum prostate specific antigen for distinguishing negative from positive biopsy: relationship to transition zone volume. *J Urol* 2000; 63: 119.
45. Crawford W. Yearly PSA screening may not be necessary with low levels PSA. *ASCO May 2002, Orlando, USA.*

Rad primljen: 15. 05. 2003

Prihvaćen za štampu: 28. 10. 2003