

## ZNAČAJ PRIMENE STANDARDIZOVANOG POSTUPKA ZA ODREĐIVANJE PSA

Nataša Lalić

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije, Beograd

*Kratak sadržaj:* Prostatični specifični antigen (PSA) je jedan od najznačajnijih specifičnih tumorskih markera. Služi za otkrivanje i praćenje karcinoma prostate. Standardizacija metoda za određivanje PSA se komplikuje pojavom PSA u serumu u obliku više izoformi. U serumu je 75–90% PSA vezano za dva glavna inhibitora i to: alfa-1-antihimotripsin i alfa-2-makroglobulin, a oko 10–15% se nalazi u slobodnoj nevezanoj formi. Postoje još dve molekulske forme PSA i to: PSA-alfa-1-proteinaza inhibitor (<1%) i PSA-inter-alfa-tripsin inhibitor (<0,1%), koji se komercijalnim testovima za određivanje PSA ne mogu odrediti. Kompleks PSA-ACT, kao i molekula slobodnog PSA poseduju antigene determinante koje omogućavaju da se PSA odredi imunološkim metodama. Molekula PSA vezana za alfa-2-makroglobulin nema antigenih determinanti, 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 na kraju 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. Veoma je važan izbor testova za određivanje PSA zato što se vrednosti PSA nekada kod jednog pacijenta prate više meseci ili godina. Da bi vrednosti za različite testove bile komparabilne i jednako korisne za kliničara između testova koji se koriste mora da postoji visok stepen korelacije. To znači da se za svaku metodu mora da odredi: najniži detekcioni limit (lower limit of detection, LLD) i biološki detekcioni limit (biologic detection limit, BDL). Određivanje analitičkih i bioloških detekcionih limita ima praktičnog značaja za rano otkrivanje recidivnih karcinoma posle radikalne prostatektomije.

*Ključne reči:* PSA, PSA-ACT, slobodni PSA, standardizacija postupka

### 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 karcino-

mom prostate. PSA se može smatrati tumorskim markerom specifičnim za prostatu. Kako ga produkuju i maligne i nemaligne ćelije prostate, PSA se ne može smatrati markerom za karcinom.

### Molekulske forme PSA

PSA se u serumu muškaraca nalazi u više molekulskih 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 (2). PSA je proteinaza sa molekulskom masom oko 30 kDa (3). 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.

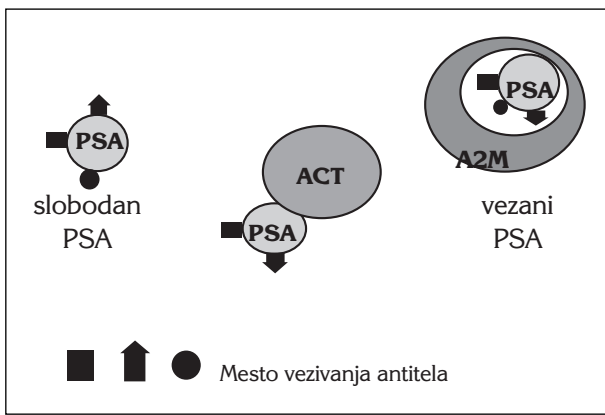
Razlika koja se javlja među izomerima potiče od različitog sadržaja sijalinske kiseline (4). Kao i većina proteaza, molekul PSA je u najvećoj meri vezan za endogene inhibitore proteaza (5). Glavni inhibitor je alfa-1-antihimotripsin (ACT). Manje količine molekula

*Adresa autora:*

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

Tabela I Molekulske forme PSA u serumu

Molekulske forme	Molekulska 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



Slika 1 Različite forme PSA

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.

#### Biolška funkcija PSA

PSA katalizuje hidrolizu brojnih proteinskih supstrata. Fiziološki, glavna uloga PSA je likvefakcija semenog koaguluma (6). PSA deluje i na druge supstrate, kao npr. na protein vezan za faktor rasta sličan insulinu (insuline-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-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 (7). Takođe je poznata uloga PSA u katalitičkoj degradaciji ekstarcelularnih matriks proteina fibronektina i laminina (8). 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

Danas postoji više od trideset komercijalnih imuno testova za određivanje ukupnog PSA i desetak testova za određivanje slobodnog PSA kao i nekoliko testova za određivanje PSA-ACT kompleksa zasnovanih na različitim principima.

Pomoću ovih testova određuju se obe najzastupljenije forme PSA molekula: kompleksiran PSA-ACT i slobodan PSA (9). 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 (10, 11). Molekul PSA vezan za alfa-2-makroglobulin nema antigene determinante, tako da se ova izoforma PSA ne može odrediti pomoću imunoloških postupaka. Testovi za određivanje PSA, 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. (12).

Ključni elementi u merenju PSA su uporedivost metoda i stabilnost seruma pre testiranja. Pokušaj da se merenje PSA, čime bi se isključio uticaj korišćenja ne-uniformnih standarda i ne-ekvimolarne detekcije različitih formi PSA, standardizuje potiče još iz 1992. godine posle Stanford konferencije koju je organizovao Stamey. Na Drugoj Stanford konferenciji o Internacionalnoj standardizaciji određivanja PSA (1994) Stamey je predložio da primarni (osnovni) kalibrator sadrži 90% prečišćenog PSA-ACT i 10% slobodnog PSA (90:10) u molarnim odnosima. Zatim je Institut za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI, ranije NCCLS) izašao sa preporukom o korišćenju tri posebna materijala koja sadrže 100% slobodnog PSA, 100% PSA-ACT kompleksa i mešavinu PSA-ACT i slobodnog PSA u odnosu 90:10 (13). Ovaj dokument je bio osnova za buduće aktivnosti u harmonizaciji određivanja PSA.

1999. godine Robert Nakamura, član internacionalnog konsultativnog komiteta za karcinom prostate sa kolegama (14) predložio je, u cilju povećanja kvaliteta merenja, a u saglasnosti sa preporukom Svetske Zdravstvene Organizacije, standardizaciju imuno određivanja prema referentnom standardu. Preporuka je uključivala sledeće:

- Slobodan PSA bi trebao da bude primarni standard za slobodni PSA i ukupni PSA;
- Test treba da pokaže ekvimolarni odgovor na slobodni PSA i PSA-ACT kompleks;
- Antitela korišćena u testu ne smeju pokazivati ukrštenu reakciju sa kalikreinom 2 (hK2);
- Referentne vrednosti za odnos slobodni/ukupni PSA treba da se ustanove za svaki test i

e. Klinička laboratorija mora da naznači u svom izveštaju kojim testom je analiza izvođena.

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 (15). Po preporuci ove grupe da bi komercijalni 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. Dilucionarna 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.

Stephan i saradnici (16) su u toku 2005. godine ispitivali uporedivost pet najčešće primenjivanih komercijalnih testova za određivanje ukupnog i slobodnog PSA pri čemu su koristili testove: Abbott (AxSYM), Beckman Coulter (Access), DPC (Immulite 2000), Roche (Elecsys 2010) i Bayer (ADVIA). Proizvođači testova su se izjasnili da su njihovi testovi kalibrirani prema WHO PSA referentnom materijalu i da u testovima primenjuju određivanja u ekvimolarnim odnosima. Dobijene vrednosti PSA u serumima pacijenata su se znatno razlikovale što može da ima ozbiljan uticaj na odluku kliničara da li da pristupi biopsiji prostate ili ne.

Dobijeni rezultati su se kretali od 87% (ADVIA i AxSYM) do 115% (Immulite) u odnosu na Access (Beckman), koji je uzet kao etalon za poređenje (100%), jer je u ovom testu ekvimolarni odnos dobro okarakterisan.

#### *Detekcioni limiti*

Određivanje analitičkih i bioloških detekcionih limita ima praktičnog značaja za rano otkrivanje recidivnih karcinoma posle radikalne prostatektomije. Teoretski, posle otklanjanja celokupnog tkiva prostate u serumu ne treba da se nalazi PSA. Praktično se u zavisnosti od osetljivosti različitih metoda za određivanje PSA, u serumu nalaze vrednosti PSA čija dinamika kretanja može da posluži za rano otkrivanje recidivnih karcinoma.

Analitička osetljivost predstavlja srednju vrednost PSA ( $\bar{x} \pm 2SD$ ) dobijenu 10 puta ponovljenim određivanjem PSA u standardu označenom kao »nula« standarda. Biološki detekcioni limit predstavlja donju granicu vrednosti PSA koju test detektuje u slučajevima kada se PSA ne nalazi u serumu jer je prostata

hiruškim zahvatom otklonjena. Vrednosti za BDL su definisane kod svakog komercijalnog testa.

Određivanje biološkog detekcionog limita pomaže kliničaru da rano odredi momenat kada je došlo do promene vrednosti PSA kao rezultat recidiva karcinoma.

#### *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 Craforda (17) 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 s 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 (17).

#### *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 vađenja 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 primenjivati u dijagnozi karcinoma prostate naročito kod osoba starijih od 60 godina (18). Evidentirana je razlika 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 prosta-

tom 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% slo-

bodnog PSA gubi po satu ukoliko serum nije odvojen od koaguluma. Takode se oko 3% slobodnog PSA gubi na dan ukoliko se serum čuva na sobnoj temperaturi, 0,4% mesečno ako se čuva na  $-20^{\circ}\text{C}$  a 0,4% mesečno ako se čuva na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Može se smatrati prihvatljivim čuvanje seruma za određivanje slobodnog i ukupnog PSA u frižideru do 24h, a ukoliko se čuva duže serum se mora zamrznuti na  $-70^{\circ}\text{C}$  (24).

### Zaključak

Standardizacija PSA testova je limitirana činjenicom da nije postavljen referentni merni sistem koji bi uključio korišćenje referentnog materijala i referentnu mernu proceduru. Ispitivanjem uporedljivosti metoda korišćenjem samo primarnog referentnog materijala (WHO referentni materijal) još uvek nije usaglašena tačnost između primarnih puferovanih standardnih materijala i seruma pacijenata, što je krajnji cilj standardizacije.

## THE SIGNIFICANS OF PSA ASSAY STANDARDIZATION

Nataša Lalić

*Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade*

*Summary:* Prostate specific antigen (PSA) is one of the most significant specific tumor markers. It serves for detection and follow-up of prostatic carcinoma. The standardisation of PSA assays is complicated, because PSA is present in serum in several isoforms. In serum about 75–90% of PSA is bound to the two main inhibitors: alpha-1-antichymotrypsin and alpha-2-macroglobulin, and about 10–15% is free. There are another two molecular forms of PSA: PSA alpha-1-proteinases-inhibitor (<1%) and PSA inter-alpha-trypsin inhibitor (<0,1%) which cannot be obtained with commercial test for PSA determination. PSA-ACT complex, as well as molecules of free PSA, have antigenic determinants enabling PSA determination by immunologic methods. PSA molecules bound to alpha-2-macroglobulin have no antigenic determinants. Therefore, this PSA isoform cannot be determined with immunologic techniques. There is a number of immunologic methods for determination of PSA. They differ according to antibodies, markers, standards and PSA values obtained. A good immunologic test needs standardized calibrators and appropriate antibodies. At the same time, the other test characteristics should be taken into account: solid phase, kinetic reaction, etc. The choice of a test is very important in determination of PSA values, because they are usually followed-up in a patient for several months or years. In order to obtain values of different tests which would be comparable and useful to a clinician, should be for each method determined: lower limit of detection (LLD) and biological detection limit (BDL). The determination of analytical and biological detection limits can be useful in early detection of relapsing cancer after radical prostatectomy.

*Key words:* PSA, PSA-ACT, free PSA, standardization of methods

**Literatura**

1. Littrup PJ. Future benefits and effectiveness of prostate cancer screening. American Cancer Society. Cancer 1997; 80: 1864–70.
2. Peehl D. Prostate specific antigen, role and function. Cancer 1995; 75: 2021–6.
3. Huber PR, Mattarelli G, Strittmatter B, et al: In vivo and in vitro complex formation of prostate specific antigen with alfa-1-anti-chymotrypsin. Prostate 1995; 27: 166–175.
4. Duffy MJ. PSA as a marker for prostate cancer: a critical review. Ann Clin Biochem 1996; 33: 511–9.
5. McCormac RT, Rittenhous HG, Finlay JA, et al: Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein gene family: A new era. Urology 1995; 45: 729–74.
6. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostate fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. J Clin Invest 1985; 76: 1899–1903.
7. 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.
8. 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.
9. Denis LJ, Murphy GP, Schroder FH. Report on the consensus for prostate cancer. Cancer 1995; 75: 1187–207.
10. Espana F, Sanchez-Cuenca J, Estelles A. Quantitative immunoassay for complexes of prostate-specific antigen with  $\alpha_2$ -macroglobulin. Clin Chem 1996; 42: 545–50.
11. 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.
12. Chan D, Sokoll L. Prostate specific antigen: update 1997. JIFCC 1997; 9: 120–126.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Primary reference preparations used to standardize calibration of immunochemical assays for serum prostate specific antigen (PSA); approved guideline. CLSI document I/LA 10-A. Wayne PA: CLSI, 1997.
14. Nakamura RM, Abrahamsson PA, Chopin D, et al. Progress in standardization and quality assessment of free PSA (prostate specific antigen), total PSA and complexes PSA immunoassays. In: Murphy G, Khoury S, Partin A, Denis L, eds. Prostate cancer: proceedings of the 2nd International Consultation on Prostate Cancer. June 27–29, 1999, Paris. WHO, 1999; 205–17.
15. Sensabaugh GF, Blake ET. Seminal plasma protein p30: Simplified purification and evidence for identity with prostate specific antigen. J Urol 1990; 144: 1523–6.
16. Stephan C, Klaas M, Muller Ch, Schnorr D, Loening S, Jung K. Interchangeability of measurements of total and free Prostate Specific Antigen in serum with 5 frequently used assay combination: At update. Clin Chem 2006; 52: 59–64.
17. Crawford W. Yearly PSA screening may not be necessary with low levels PSA. ASCO May 2002, Orlando, USA.
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, Petterson 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  $\alpha_1$ -antichymotrypsin in blood samples. Urology 1996; 48 Suppl 6A: 81–7.

*Rad primljen: 10. 03. 2006*

*Prihvaćen za štampu: 24. 03. 2006*