

# RESNICA O SPECIFIČNEM ANTIGENU PROSTATE

Ivan Vrhovec, Pia Ulaga - Čokl

**Ključne besede:** *prostata specifični antigen, rak prostate, rak dojke*

## Povzetek

Prostatični specifični antigen (PSA) je glikoprotein z molekulske maso okrog 34 000 D in pripada skupini serumskih proteinov iz družine kalikreinov. Po letu 1980, ko so ugotovili njegovo povezanost z rakom prostate, se PSA množično uporablja kot tumorski označevalec za spremljanje bolnikov s to boleznijo.

Odkritja med leti 1984 in 1994, da je mogoče PSA določati z imunohistokemijskimi in ultra občutljivimi tehnikami tudi v drugih tkivih, so ovrgla trditve, da je PSA tkivno in spolno specifični označevalec. Vse več je spoznanj, da bi bil PSA v določljivih koncentracijah v tumorskem tkivu dojke lahko tudi dober napovedni dejavnik pri raku dojke.

## Uvod

Prostatični specifični antigen so odkrili v 70-ih letih. Že poročila iz leta 1960 opisujejo proizvodnjo protiteles proti enemu ali več prostatičnim antigenom. Neka študija opisuje antigen, ki so ga opazili v serumu bolnikov z benigno prostatično hipertrofijo (BPH) in rakom prostate. To bi lahko bil PSA. Zaradi pomanjkanja okarakterizacije tega in drugih opaženih potencialnih prostatičnih antigenov niso nobenega od teh raziskovalcev spoznali za odkritelja PSA. Hara iz Japonske je iskal specifični označevalec za spermo in identificiral PSA v semenski plazmi leta 1966. Imenoval ga je g-seminoprotein. Leta 1973 sta Li in Beling identificirala isto molekulo in jo poimenovala Protein E na osnovi njene elektroforezne mobilnosti. Leta 1978 je Sensabaugh bolj popolno okarakteriziral PSA in ga po njegovi velikosti poimenoval Protein p30. Dandanes vemo, da so  $\gamma$ -seminoprotein, Protein E, Protein p30 in PSA ena in ista molekula (1). PSA je prvič opisal pod današnjim imenom Wang s sod. leta 1977 in ga dokončno okarakteriziral leta 1979 (2). Izolirali, očistili in identificirali so ga iz prostatičnega tkiva in semenske plazme. Istočasno in neodvisno je Graves s sod. s pomočjo akrilamidnega gela izoliral in okarakteriziral enako beljakovino v semenski plazmi.

V zadnjih petnajstih letih je bilo objavljenih mnogo člankov o biokemiji PSA, po letu 1980 pa tudi povezanosti PSA z rakom prostate. Tega leta so namreč ugotovili, da je PSA v serumu bolnikov z rakom prostate povišan in od takrat se testi na PSA množično uporabljajo za spremljanje bolnikov s to boleznijo.

## BIOSINTEZA

PSA gen se nahaja na kromosomu 19 in vsebuje 4 introne in 5 eksonov (6 kb). Gen hKLK3, ki kodira PSA, so klonirali in mu določili sekvenco. Ugotovili so, da

ima homologijo z geni, ki kodirajo proteinaze kalikreinske družine. PSA gen zaradi tega pripada človeški glandularni kalikreinski genski družini. Do istega zaključka so prišli na podlagi podobnih aminokislinskih sekvenc predstavnikov kalikreinske družine serinskih proteinaz in PSA. PSA ima 57% sekvenčno indentiteto s kalikreini in 56% z  $\gamma$ -živčnim rastnim faktorjem. Zanimivo je, da so geni vseh treh članov človeške kalikreinske družine (človeški pankreatični/renalni kalikrein, človeški glandularni kalikrein-1 in PSA) locirani na daljšem kraku 19 kromosoma (1,2).

Za PSA so do nedavno mislili, da ga ekskluzivno proizvajajo epitelijske celice, ki obdajajo acine in duktuse prostate. PSA so zaznali v endoplazmatskem retikulumu celic prostatičnega epitelijskega tkiva, v sekretiranih žlezah in na luminalni površini. V stebrastih (kolumoidalnih) in kockastih (kuboidalnih) celicah acinov se nahaja v citoplazemskih granulah in veziklih, v grobem endoplazmatskem retikulumu (RER), v vakuolah in izločevalnih granulah ter v lizosomskih gostih telesih. V bazalnih celicah acinov PSA niso zasledili. Celična lokalizacija PSA je enaka pri normalnem, malignem in BPH tkivu. Na podlagi nahajanja molekule so domnevali, da se verjetno sintetizira v RER prostatičnih epitelijskih duktusnih celicah, shranjuje v veziklih in vakuolah ter sprošča v lumen žleze z eksocitozo. PSA se torej sintetizira v epitelijskih celicah žleze prostate in se nato izloči v semensko tekočino (1). Stalna sekvenca Gly-Trp-Gly, ki jo najdemo v večini serinskih proteinaz (140-142 v kimotripsinu), se nahaja na homologni poziciji tudi v PSA (132-134). Za to sekvenco so ugotovili, da leži na začetku avtoliznega loka v kimotripsinu. Menijo, da igra pomembno vlogo v pretvorbi fleksibilne zimogene strukture v fiksno, togo orientacijo v aktivirani proteinazi (3).

Na osnovi cDNA sekvence se zdi, da se PSA sintetizira kot proencim, ki vsebuje aktivacijski peptid, vendar se izloča v semensko tekočino kot aktiven encim. Proencima še niso indentificirali (4).

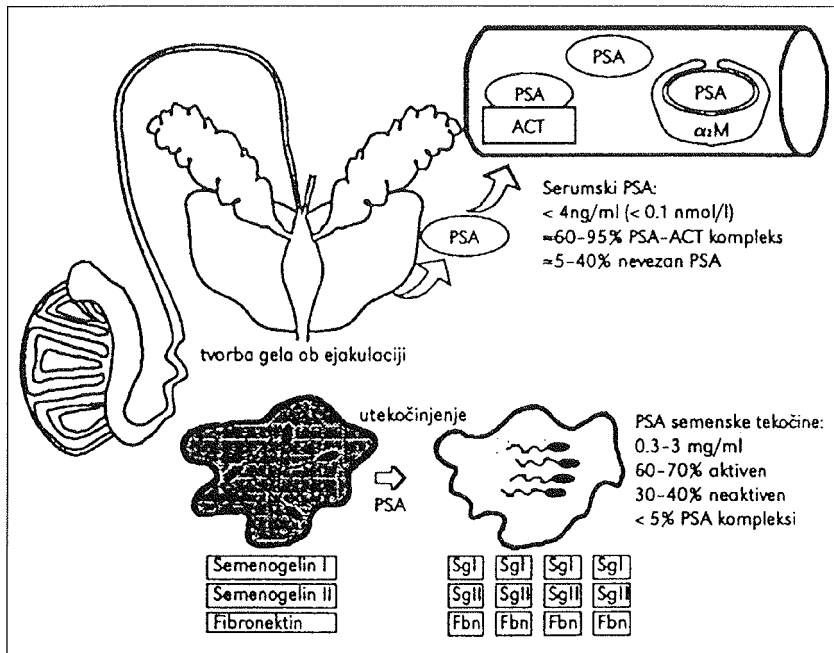
## **FIZIOLOŠKA VLOGA PSA**

Dokazano je, da predvsem PSA povzroča raztopitev gelske strukture človeške sperme. PSA raztopi gel, ki je ujel spermo, tako da proteolizira beljakovine, odgovorne za tvorbo gela. Glavni strukturni beljakovini gela sta semenogelin I in II (Sgl in SgII), fibronektin pa predstavlja manjši del. Utekočinjenje ejakulata je končano v nekaj minutah, takoj po cepitvi Sgl, SgII in fibronektina na manjše, topne fragmente in sprostitev progresivno mobilnih spermatozoev. PSA torej pripomore k aktivaciji mobilnosti sperme. N-terminalni konci fragmentov so v skladu z omejeno kimotripsinu podobno aktivnostjo PSA. Glavni fiziološki substrati za indentifikacijo PSA so beljakovine, ki tvorijo gel. Proizvajajo in izločajo se iz semenskih veziklov (1, 8).

Fiziološka vloga PSA v tkivu in tumorjih neprostatičnega izvora ni znana. Če ima PSA kakšno pomembno biološko vlogo v neprostatičnem tkivu, kot je npr. dojka, je neznano. Razumno bi bilo sklepati, da PSA encimsko deluje na enega ali več substratov in modificira njihovo delovanje v obliki, ki je podobna funkcioniranju drugih proteinaz kalikreinske družine. Te substrate bo treba še indentificirati. Trenutno razpoložljivi podatki o prostatičnem tkivu podpirajo idejo, da je PSA vpleten pri regulaciji rasti tkiv dojke in drugih tkiv. Zdi se, da je PSA ali rastni faktor ali regulator rasti tkiv faktorjev in da ima vlogo v fetalnem

razvoju. Substrata ali substratov za PSA v teh tkivih do sedaj še niso indentificirali. Yu in Diamandis sta ugotovila, da s pomočjo sedanjih tehnik nismo sposobni zaznati encimske aktivnosti PSA pri ultra nizkih koncentracijah ( $< 1 \mu\text{g/L}$ ). Če ne bodo našli mnogo večjih količin PSA v teh neprostatičnih tkivih med nosečnostjo in embriogenezo, lahko dvomimo, da igra proteolitična aktivnost PSA pomembno vlogo pri reguliranju rasti teh tkiv (5, 6, 7).

**Slika 1.** Shematski prikaz moškega reprodukcijskega sistema (8).



V vseh tkivih in tekočinah neprostatičnega izvora, ki so bile pregledane, je prevladujoča oblika PSA nekompleksiran,  $33 \text{ kDa}$ , prost PSA monomer, ki je encimsko aktivna oblika tega encima. Obstajajo tudi kompleksi s proteinaznimi inhibitorji, vendar v mnogo nižjih koncentracijah (7).

## REGULACIJA ENCIMSKÉ AKTIVNOSTI PSA

Aktivnost proteolitičnih encimov je v telesu kontrolirana, da bi se preprečili mogoči škodljivi učinki njihovega prekomernega delovanja. Poznamo tri glavne načine kontrole:

- izločanje neaktivnih encimskih prekurzorjev, zimogenov
- proteolitična deaktivacija aktivnih encimov in
- inhibicija encimske aktivnosti z inhibitorji

Pri analiznem delu za klinično uporabo je gotovo najpomembnejša inhibicija encimske aktivnosti encima PSA.

60-70% delež encimsko aktivnega PSA v semenski tekočini lahko delno pripišemo dejstvu, da je nivo inhibitorjev serinskih proteinaz v moškem genitalnem traktu prenizek, da bi zagotovil regulacijo PSA aktivnosti na ekvimolarnem nivoju. To je mogoče ponazoriti z nedavno opisanim PCI, ki je v relativno visokih koncentracijah navzoč v semenski tekočini. PCI je ~57-kDa glikoprotein, ki ima eno verigo in pripada superdružini inhibitorjev ekstracelularnih serinskih proteinaz, med katere spadata tudi  $\alpha_1$ -antitripsin in  $\alpha_1$ -antikimotripsin (ACT). Izvor izločanja PCI v semensko tekočino so predvsem semenski mešički, lahko pa sta tudi prostata in epididimis. V semenski tekočini se približno 40% PCI pojavlja v kompleksu s PSA. Kompleksi med PSA in PCI v semenski plazmi ustrezajo deaktivaciji manj kot 5% encimsko aktivnega PSA. Nezadostnost za regulacijo aktivnostne zmogljivosti PSA na ekvimolarnem nivoju lahko razložimo s koncentracijo PCI v semenski tekočini (~3-4  $\mu\text{mol/L}$ ), ki je manjša od desetine koncentracije encimsko aktivnega PSA (~30  $\mu\text{mol/L}$ ). Zanimivo je, da se kompleksna formacija med PSA in ACT "in vivo" lahko pojavi že v prostati, ker epitelijske celice, ki proizvajajo PSA, proizvajajo tudi ACT. Kljub temu je pričakovana koncentracija PSA v semenski tekočini v obliki kompleksa z ACT mnogo manjša kot koncentracija PSA v kompleksu s PCI, ker domnevajo, da je pogostnost transkripcije ACT v normalni prostati 1% le-te od PSA (8, 9).

Formacijo kompleksa med PSA in dvema glavnima proteinaznima inhibitorjema v serumu  $\alpha_1$ -antikimotripsinom (ACT) in  $\alpha_2$ -makroglobulinom ( $\alpha_2\text{M}$ ) so proučevali "in vitro" in ugotovili, da z obema tvori stabilne komplekse. Zanimivo je, da PSA "in vitro" tvori komplekse z  $\alpha_2\text{M}$  pogosteje kot z ACT, zaradi česar domnevajo, da morda značilna frakcija katalitično aktivnega PSA tvori kompleks z  $\alpha_2\text{M}$ . Rezultat reakcije med PSA in ACT je deaktivacija PSA s tvorbo ~90 kDa kompleksa v molarnem razmerju 1:1 (PSA-ACT) in razcep notranje peptidne vezi za Leu-358 v ACT molekuli. Nastali kompleks z ACT še vedno dopušča PSA, da izpostavlja nekaj antigenskih determinant, ki jih prepoznajo določena PSA protitelesa. V nasprotju s tem pa po tvorbi kompleksa med PSA in  $\alpha_2\text{M}$  "in vitro" ni nezavarovanih PSA epitopov. Vsi PSA epitopi so namreč skriti znotraj  $\alpha_2\text{M}$  molekule, ki obda PSA. Na ta način je ciljni protein zaščiten pred interakcijami s proteinskimi substrati visokih molekulskih mas (protitelesa proti PSA), aktivnost PSA pa še vedno lahko zaznamo ob uporabi nizko-molekularnih sintetičnih substratov. Zaradi inkapsulacije PSA in popolnega prekrija PSA epitopov je pomembnost tega kompleksa "in vivo" nejasna (5).

## **BIOLOŠKA IN ANALITSKA STABILNOST PSA**

Biološka stabilnost (1). Intra-individualna spremenljivost PSA je približno 6.2% v obdobju 3 dni in ne kaže vsakodnevnih spremenljivosti. Opazili so, da pri hospitaliziranih bolnikih pade PSA koncentracija za 18 - 50 % v 24 urah po prihodu. Mogoč vzrok je ležeč položaj bolnikov.

Znano je, da povprečna vrednost PSA pri moških narašča z leti. Babaian s sod. je ugotovil, da ima 10.7% moških mlajših od 60 let, in 40 % moških starejših od 60 let, vrednosti PSA nad 4  $\mu\text{g/L}$ . Haare in Alexander sta objavila, da

ima PSA vrednosti nad 4.2  $\mu\text{g/L}$  3 % moških med 40 -49 letom starosti, 9.7 % moških med 50 - 59 letom starosti, 10.5 % moških med 60 - 69 letom starosti in 15.3 % moških med 70 - 86 letom starosti.

PSA kaže tudi etnično spremenljivost. Kuriyama s sod. je določil zgornjo normalno mejo za Japonce (1.2  $\mu\text{g/L}$ , n =158) in Američane (2.5  $\mu\text{g/L}$ , n = 68). Martin s sod. pa je ugotovil, da se tudi v normalnem tkivu koncentracija PSA na volumen prostate razlikuje v različnih etničnih skupinah.

Analitska stabilnost (1). Stabilnost PSA "in vitro" je še vedno predmet razprave. Ugotovljeno je bilo, da je PSA v serumu stabilen 24 - 48 ur, če je shranjen na sobni temperaturi brez regulacije pH. Celo po 4 dneh na sobni temperaturi je bil izkoristek 96 %. Pri 4 °C je PSA stabilen 14 dni, če pa je zmrznjen pri - 20 °C, je stabilen od 6 mesecev do 12 let.

Simm in Gleeson svarita, da lahko več kot eno zamrzovanje in odmrzovanje povzroči napačno določitev dejanske koncentracije PSA (višjo ali nižjo). Nasprotno pa trdi van Dieijen-Visser s sod. (10), da niso zaznali vpliva zamrzovanja in odmrzovanja na določitev PSA.

## **TKIVNA SPECIFIČNOST PSA**

Od odkritja pred več kot desetimi leti so PSA imeli za semensko specifičen, tkivno specifičen in spolno specifičen označevalec. Zaradi navidezne specifičnosti so ga intezivno preučevali in dokazali, da je odličen antigenski označevalec za različne klinične in sodne potrebe. Logično je namreč, da bolj kot je označevalec tkivno specifičen, bolj je tudi občutljiv za zaznavanje rastočega tumorja (1,5).

PSA ni specifičen za raka, ker ga najdemo v normalnem, hiperplastičnem in malignem prostatičnem tkivu ter v metastatičnih prostatičnih karcinomih. Ločevanje BPH od raka prostate je velik izziv (1).

V zadnjih nekaj letih so številna poročila nasprotovala absolutni tkivni specifičnosti PSA. Odkritje leta 1984, da lahko PSA določamo z imunohistokemijskimi metodami v ženskih periuretralnih žlezah, je spodbilo predstavo, da je PSA absolutno specifičen za prostato, spermo in spol. Z uporabo podobnih metod so kasneje odkrili PSA tudi v drugih tkivih, kar nadalje spodbija absolutno tkivno in spolno specifičnost PSA. Papotti s sod. je leta 1989 dognal, da so nekateri karcinomi apokrinih žlez znojnic in nekateri redki apokrini karcinomi dojke pozitivni na PSA, če uporabimo poliklonska protitelesa v imunohistokemiji. Nobeden od teh tumorjev ni bil pozitiven na PSA, če so uporabili monoklonska protitelesa, zato so zaključili, da so bili pozitivni rezultati posledica navzkrižnega reagiranja poliklonskih protiteles. Pummer s sod. je pisal o povišanih nivojih imunoreaktivnega PSA v serumu žensk s karcinomom renalnih celic (1992), toda tudi to najdbo so razložili kot posledico uporabe poliklonskih protiteles v imunoanalizi, ker ob uporabi metode z monoklonskimi protitelesi niso dobili takšnih interferenc. Nedavno (1992) sta McLachlin in Srigley opisala dva primera zrelega cističnega teratoma jajčnikov, ki sta vsebovala tkivo, pozitivno na PSA. PSA so določili tudi v analnih (1990) in periuretralnih (1992) moških žlezah. Z zasleditvijo PSA v urinu moških, ki so prestali cistoprostatektomijo, so odkrili, da je moška uretra dodaten, majhen, a merljiv vir

PSA (1993). Pred kratkim (1993) je Van Krieken predstavil dokaze o redki produkciji PSA v neoplazmah žleze slinavke (5,7).

Težko se je bilo sprizniti z dejstvom, da PSA ni absolutno tkivno specifičen in če se je le dalo, so rezultate, ki so spodbijali tkivno specifičnost, razložili kako drugače. V letu 1994 in v začetku naslednjega leta pa so si poročila o nenavadnih in zanimivih odkritjih kar sledila. Pionirsko delo na tem področju sta gotovo opravila Yu in Diamandis. Še vedno domnevno tkivno specifičen antigen PSA sta v ločenih študijah našla v zelo nizkih koncentracijah v 30% citosolov tumorjev dojke in v manjšem odstotku v drugih tumorjih, v številni pljučne, črevesne, jajčne, jetrne, ledvične, adrenalne in parotidne (obušesne). Dokazala sta ga tudi v normalni dojki, človeškem mleku, cistični tekočini dojk in v amnijski tekočini. V vseh teh študijah sta uporabljala visoko občutljivo kemiluminescentno metodo (11). Normalna ženska dojka lahko proizvaja velike količine PSA pri ženskah, ki dobivajo progestin vsebujočo oralno kontracepcijo. Tudi po porodu proizvajajo normalne dojke PSA in ga izločajo v veikiin koiciinān v mlieko doječīn žensk. V amnijski tekočini kot tudi v serumu nosečih žensk koncentracije PSA naraščajo z nosečnostjo od 11 do 21 tedna in po tem izginejo ali počasi padajo. Nedavno so opazili povezavo med fetusi z različnimi prirojenimi abnormalnostmi in abnormalnimi PSA koncentracijami v amnijski tekočini. Clements in Mukhtar, ki sta dokazala (1994), da je PSA prisoten v normalnem endometrijskem tkivu, se ukvarjata z idejo, da ima PSA vlogo lokalnega regulatorja maternične funkcije, toda substrat za to delovanje je trenutno še neznan (6,12,13,14).

Vsi ti podatki kažejo na to, da lahko določeni tumorji in tkiva, drugačna od prostate, proizvajajo nizke koncentracije PSA. Treba je priznati, da PSA ne moremo več imeti za absolutno tkivno specifičen označevalec.

Trenutno je tudi veliko vprašanje, če te majhne količine PSA neprostatičnega izvora interferirajo s klinično uporabnostjo PSA pri ugotavljanju in spremljanju raka prostate. Študije, ki so bile narejene na tem področju, kažejo, da ti zelo nizki neprostatični viri serumskega PSA ne ovirajo doseganje uporabe PSA. Koncentracije PSA neprostatičnega izvora, določene z ultraobčutljivo metodo pri bolnikih po radikalni cistoprostatektomiji, so bile namreč  $< 0.1 \mu\text{g/L}$ . Te vrednosti so zanemarljive pri odkrivanju rezidualnega raka prostate v ekstremno zgodnjem stadiju (5).

V serumu zdravih moških so vrednosti PSA pod  $4 \mu\text{g/L}$ . Prostatični epitelij v žleznih duktusih izloča PSA in učinkovito preprečuje uhajanje proteinaze v krvotok. Vseeno pa manjše količine PSA vstopajo v krvotok in razmerje med koncentracijo PSA v semenski plazmi ( $0.5 - 3 \text{ g/L}$ ) ter koncentracijo PSA v serumu ( $< 4 \mu\text{g/L}$ ) je približno 106 (8).

Serumski PSA je prisoten v dveh molekulkih oblikah: kot prosti PSA z molekulkso maso  $\hat{Z}$  33 kDa in kot PSA, vezan na proteinazne inhibitorje, predvsem na ACT z molekulkso maso  $\hat{Z}$  100 kDa in  $\alpha_2\text{M}$  z molekulkso maso  $\hat{Z}$  800 kDa. PSA-ACT kompleks prevladuje v serumu (70 - 95%), čeprav je tvorba kompleksa "in vitro" med čistimi beljakovinami počasna, preostali del pa je v prosti obliki (4, 7, 9). Lahko rečemo, da je razmerje med PSA in PSA-ACT v serumu približno 1 : 4, čeprav nekateri strokovnjaki trdijo, da je 90 % PSA v

kompleksu z ACT, preostalih 10 % pa predstavlja prosti PSA (8). Na osnovi tega razmerja domnevajo, da aktivna oblika PSA izgine iz duktusov, ker je za tvorbo PSA-ACT kompleksa, pretežno detektiranega v krvotoku, potrebna aktivna proteinaza. Ni podrobnih podatkov o tem, ali je prosta oblika PSA v serumu zimogen ali je notranje cepljena, in na ta način deaktivirana oblika zrelega PSA, ali je to encimsko aktivni PSA, ki še ni tvoril kompleksov. Mogoče je, da prosti PSA predstavlja vse tri oblike, je pa malo verjetno. Če je PSA, splavljen v krvotok, aktiven, lahko pričakujemo, da bo tvoril komplekse z ACT in  $\alpha_2M$ , ki deaktivirajo katalitično aktivnost PSA. Ker oba ACT in  $\alpha_2M$  v serumu obstajata v 104 - 105- kratnem molarnem presežku v primerjavi s PSA, je torej malo verjetno, da je prosta oblika PSA v serumu encimsko aktivna.

V človeški semenski tekočini ga najdemo v visoki koncentraciji (0.5 - 3 g/L). Je ena od treh najbolj pogostih iz prostate izločenih beljakovin. Dve tretjini PSA je encimsko aktivnega in sposobnega tvoriti komplekse s proteinaznimi inhibitorji, preostalih 30 - 40 % PSA pa je neaktivnega zaradi notranjih cepitev. Pojavlja se predvsem v prosti obliki, nekaj odstotkov (1 -2 %) pa ga je v kompleksih s proteinaznimi inhibitorji (PCI, ACT ali  $\alpha_2M$ ) (4, 8).

Ker ženske nimajo prostate, so mnogo let domnevali, da ženske ne proizvajajo PSA v nobenem tkivu in da PSA ni prisoten v ženskem krvotoku. Tako tudi ni bilo posebnega razloga, da bi pri ženskah merili PSA ali pričakovali, da ga bodo pri njih določili. V mnogih študijah, povezanih s PSA, so prav zaradi prepričanja, da so koncentracije PSA pri ženskah nedoločljivo nizke, vključevali ženske kot referenčno populacijo. Nekateri znanstveniki so na ta način zaznali določljive vrednosti PSA pri ženskah. Chan s sod. (15) je dobil pri treh zdravih ženskah nepričakovano visoke koncentracije PSA, vendar jih je pripisal nespecifični vezavi v RIA. Tudi Rock s sod. (16) je pri 2 ženskah od 91 izmeril koncentraciji, ki sta presegali 0.1  $\mu\text{g/L}$ , vendar je tudi on zaključil, da gre za za napako, zaradi ročno izdelanih rezultatov.

Zanimivo je, da imajo ženske žlezo, ekvivalentno prostati. Te parauretralne duktuse in žlezo je prvič opisal Graaf že leta 1672, ponovno pa jih je odkril Skene leta 1880 in jih danes poznamo kot Skenejevo žlezo. Le-ta kaže precejšnjo individualno spremenljivost. Pri nekaterih ženskah je dobro razvita in vsebuje visoko aktivnost kisle fosfataze (PAP), pri drugih pa ne (1).

PSA so imunohistokemijsko lokalizirali prav v ženski periuretralni žlezi. Ta najdba je navedla Wernert-a in sod. k predlogu, da naj bo "ženska prostata" periuretralna žleza, ker jih je 67 % pozitivnih na PSA in imajo histološki videz podoben prostati pred puberteto. Z novo razvito, zelo občutljivo metodo za PSA (11) so ugotovili, da imajo nekatere ženske merljive vrednosti serumskega PSA. Tkivni izvor tega PSA še vedno ni znan. Diamandis s sod. trdi, da ženski serumski PSA izvira iz dojk. Pri preučevanju 1061 serumov zdravih in hospitaliziranih žensk je dokazal, da ima 1.5% žensk serumske PSA vrednosti enake 0.01  $\mu\text{g/L}$  ali višje. Ugotovil je, da so ti PSA pozitivni vzorci povezani z ženskami nad 50 letom starosti. Logično je sklepal, da steroidni hormoni (androgeni, progestini ali glukokortikoidi) stimulirajo tarčni organ (žensko dojko, periuretralno žlezo ali neznan organ) za proizvodnjo in izplavljenje PSA v krvotok (7).

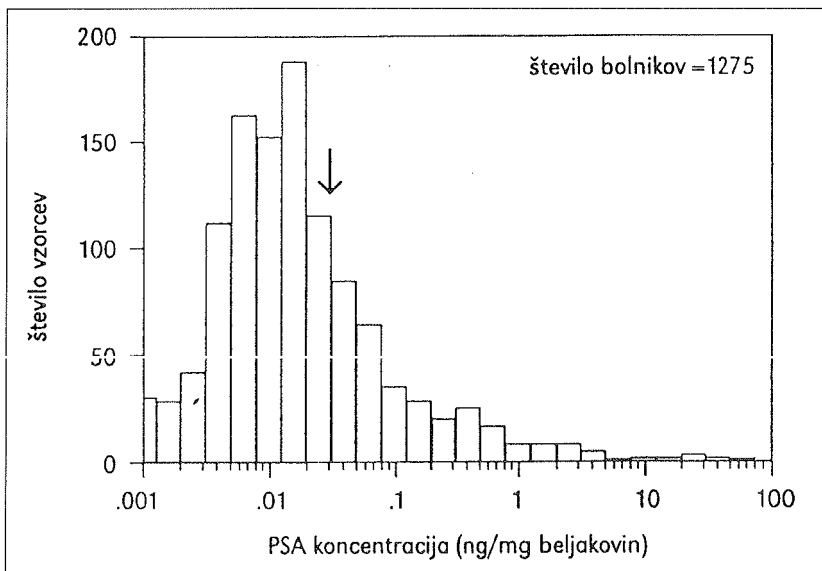
Testiranje mladih zdravih žensk iz različnih etničnih skupin je pokazalo, da tudi pri ženskah koncentracija PSA etnično variira. Pri belkah in črnkah so se PSA vrednosti gibale med 0.0 in 0.36  $\mu\text{g/L}$ , pri špankah pa med 0.0 in 2.2  $\mu\text{g/L}$  (1).

## RAK DOJKE IN PSA

Z uporabo ultraobčutljive imunske metode za PSA je Diamandis s sod. ugotovil, da je PSA zelo pogost v ženskih citosolnih ekstraktih tumorjev dojke. Pri "cutoff" nivoju 0.015 ng PSA/mg beljakovin je bilo 50% tumorjev dojke pozitivnih na PSA, pri "cutoff" nivoju 0.030 ng/mg beljakovin pa jih je bilo pozitivnih 30%. Nekateri tumorji dojke so vsebovali celo več kot 50 ng/mg beljakovin (slika 2). Molekulska masa PSA v ženskih tumorjih dojke je identična molekularni masi semenskega PSA in prostega serumskega PSA (č33 kDa). Ta oblika PSA je domnevno encimsko aktivna, toda aktivnosti niso testirali v ekstraktih tumorjev dojke.

**Slika 2.** Porazdelitev koncentracij PSA v 1275 tumorjih dojke (7).

S puščico je označena koncentracija PSA, ki predstavlja ločnico med PSA pozitivnimi in PSA negativnimi tumorji (0.03 ng/mg beljakovin).



Preučevanje povezav med koncentracijami PSA in koncentracijami progesteronskih in estrogenskih receptorjev pri ženskem raku dojke je jasno pokazalo, da je PSA povezan s prisotnostjo progesteronskih, ne pa estrogenskih receptorjev. Predmenopavzne ženske ali ženske v zgodnjem stadiju bolezni so pogosteje PSA pozitivne kot pomenopavzne ženske ali ženske v poznem stadiju bolezni. Preživetvene analize so pokazale, da bolnice s tumorjem dojke, ki proizvaja PSA, živijo dlje in imajo manj pogosto ponovitev bolezni kot bolnice



s tumorji, ki ne proizvajajo PSA. V primeru raka dojke bi bil lahko PSA ugoden prognostični indikator. Tkivna koncentracija PSA bi lahko imela napovedovalne lastnosti pri določanju prognoze raka, podobno kot jo imajo estrogeni in progesteronski receptorji pri tej bolezni.

Ugotovitve Diamandisove skupine o obstajanju PSA v dojkinih, črevesnih, jajčnih, obušesnih, jetrnih, ledvičnih in pljučnih tumorjih, stimuliranih normalnih dojkah, amnijski tekočini in mleku dojke ter podatki ostalih raziskovalcev napeljujejo na to, da PSA ne moremo več obravnavati kot specifičen prostatični označevalec in fiziološko molekulo, ki je povezana le z utekočinjenjem sperme. Namesto tega bi morali reči, da je PSA molekula, ki jo lahko pod pogoji steroidne hormonske stimulacije proizvajajo celice, ki vsebujejo steroidne hormonske receptorje. Z novimi ugotovitvami, da je PSA mogoče rasti faktor ali citokin ali regulator rasti faktorjev, utegne biti biološka vloga PSA v normalnem tkivu, tumorjih in med nosečnostjo mnogo bolj kompleksna, kot so mislili (7).

## **METODE ZA KVANTITATIVNO DOLOČANJE PSA**

Za merjenje PSA so razvili različne imunske tehnike. Pri imunskih tehnikah na splošno merimo imunskoreaktivne molekule, imunska reaktivnost pa je v večini primerov identična z iskano biološko aktivnostjo molekul. Osnova vsem imunskim metodam je reakcija med antigenom (Ag) in protitelesom (Ab).

Razlike med metodami so v uporabljenem protitelesu (monoklonsko, poliklonsko, njihov izvor), v številu protiteles (eden, dva ali trije), v zaznamovalcu (izotop, encim,...), v tem, kaj zaznamujemo (protitelo ali antigen) in v načinu merjenja nastalega kompleksa, ki je seveda določen z izbranim indikatorjem.

Sedanji komercialni imunski testi za PSA merijo le prosti PSA in PSA-ACT kompleks. Količina PSA v kompleksu z  $\alpha_2$ M ni znana, ker inkapsulacija PSA v  $\alpha_2$ M molekuli preprečuje imunodetekcijo PSA. PSA- $\alpha_2$ M kompleksa protitelesa proti PSA ne prepoznavajo. Če ustvarimo denaturacijske pogoje za razvitje PSA- $\alpha_2$ M kompleksa z natrijevim dodecilsulfatom (SDS), lahko ta kompleks odkrijemo v serumu z "immunoblotting". Poleg omenjenih oblik lahko določimo tudi manjše količine PSA v kompleksu z drugimi proteinaznimi inhibitorji kot sta  $\alpha_1$ -antitripsin in inhibitor inter-a-tripsina, vendar te koncentracije ne predstavljajo pomembnega prispevka h koncentraciji imunodetektiranega PSA (4, 6, 8, 9, 11).

Velika težava v analitiki PSA je pomanjkanje univerzalnih sprejemljivih standardnih preparatov. Glavni namen standardizacije immunoanaliz je, da so standardi podobni analitu, ki ga določamo, kolikor je le mogoče. Zaradi odsotnosti skupnega standarda in heterogenosti PSA v serumu se standardizacije trenutno razpoložljivih PSA metod znatno razlikujejo. Za immunoanalize splošno velja, da je ugodno, da uporabljamo človeški serum kot matriks za standarde, toda PSA metode so izjema. Če so standardi narejeni tako, da je čisti PSA dodan človeškemu serumu, večina intaktnih PSA molekul tvori komplekse z  $\alpha_2$ M in manjši del z ACT. Ker je kompleks z  $\alpha_2$ M nemerljiv, pride do izgube imunoreaktivnosti PSA in določene koncentracije standardov so previsoke. S tem fenomenom lahko razložimo visoke vrednosti, dobljene z nekaterimi metoda-

mi. Da bi preprečili tvorbo kompleksa z  $\alpha_2M$ , je koristno pripraviti standarde za določanje PSA v umetnih, na beljakovinah temelječih pufrih. Veljavni standardi komercialnih referenčnih kompletov temeljijo na človeškem serumu ali sintetičnih matriksih z govejim serumskim albuminom (BSA), ki vsebuje PSA iz človeške semenske plazme. Potemtakem so podfrakcije PSA v standardih drugačne od tistih v serumu, kar lahko vodi do različnih rezultatov zaradi že omenjenega razloga (monoklonska in/ali poliklonska protitelesa prepoznajo različne podfrakcije PSA z različno afiniteto).

Eden od načinov za minimalizacijo tega problema, ki ga že uporabljajo, je, da različne analizne metode prilagodimo in umerimo na eno samo metodo. Navadno so standardi novih metod tako umerjeni, da se ujemajo z reagenčnim kompletom Hybritech Tandem-R, ki se vsesplošno uporablja in je odobren od FDA. Pri tej metodi so standardi preparirani v serumu, v katerem je  $\alpha_2M$  inaktiviran, torej PSA tvori komplekse le z ACT. Ker ta metoda meri PSA in PSA-ACT precej enako, se zdi, da meri vsoto PSA in PSA-ACT precej točno, če upoštevamo le koncentracijo PSA. Seveda so koncentracije PSA oziroma rezultati, dobljeni s temi metodami, v zelo dobri korelaciji z rezultati metode Hybritech Tandem-R. Dobra korelacija med metodami pa še ne pomeni, da smo merili enake oblike PSA (17).

Prav dejstvo, da dajo različne tehnike določanja PSA pogosto zelo različne rezultate zaradi detekcije različnih oblik PSA, je pripeljalo raziskovalce do zaključka, da je posamezna oblika PSA lahko povezana z določeno vrsto bolezni.

Mnogi avtorji so se trudili, da bi z upoštevanjem več parametrov in PSA izračunali razmerje, ki bi lahko dovolj zanesljivo razlikovalo maligno od benigne oblike bolezni prostate (18,19,20).

Za klinično uporabo bo zelo uporabna ugotovitev, da je v področju zmerne povečanja celokupnega PSA med 4 in 10  $\mu\text{g/L}$  mogoče ločiti med BPH in karcinomom prostate z določitvijo deleža proste frakcije PSA. V ta namen so že razvili protitelesa, ki zaznajo v vzorcu seruma samo prosto obliko PSA. S tem se bosta zanesljivost in uporabnost določitve različnih oblik prostate specifičnega antigena še povečali.

## Literatura

1. Armbruster DA. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem* 1993; 39: 181-195.
2. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979; 17: 159-163.
3. Watt KWK, Lee PJ, M'Timkulu T, Chan WP, Loo R. Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 3166-3170.
4. Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM. Standardization of PSA determinations. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 45-51.

5. Graves HCB. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen: a steroid hormone-dependent phenomenon? EDITORIAL. *Clin Chem* 1995; 41: 7-9.
6. Yu H, Diamandis EP. Prostate specific antigen in milk of lactating women. *Clin Chem* 1995; 41: 54-58.
7. Diamandis EP. New diagnostic applications and physiological functions of prostate specific antigen. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 105-112.
8. Malm J, Lilja H. Biochemistry of prostate specific antigen, PSA. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 15-22.
9. Lilja H. Significance of different molecular forms of serum PSA. The free, noncomplexed form of PSA versus that complexed to alpha 1-antichymotrypsin. *Urol Clin North Am* 1993; 20: 681-686.
10. Van Dieijen-Visser MP, Delaere KPJ, Gijzen AHJ, Brumbacher PJ. A comparative study on the diagnostic value of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostate specific antigen (PSA) in patients with carcinoma of the prostate gland. *Clin Chem Acta* 1988; 174: 131-140.
11. Yu H, Diamandis EP. Ultrasensitive time-resolved immunofluorometric assay of prostate specific antigen in serum and preliminary clinical studies. *Clin Chem* 1993; 39: 2108-2114.
12. Diamandis EP, Yu H, Sutherland DJA. Detection of prostate specific antigen immunoreactivity in breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32: 301-310.
13. Yu H, Diamandis EP. Prostate specific antigen immunoreactivity in amniotic fluid. *Clin Chem* 1995; 41: 204-210.
14. Yu H, Diamandis EP, Monne M, Croce CM. Oral contraceptive-induced expression of prostate specific antigen in the female breast. *J Biol Chem* 1995; 270: 6615-6618.
15. Chan DW, Bruzek DJ, Oesterling JE, Rock RC, Walsh PC. Prostate specific antigen as a marker for prostatic cancer: a monoclonal and polyclonal immunoassay compared. *Clin Chem* 1987; 33: 1916-1920.
16. Rock RC, Chan DW, Bruzek D, Waldron C, Oesterling J, Walsh P. Evaluation of a monoclonal immunoradiometric assay for prostate specific antigen. *Clin Chem* 1987; 33: 2257-2261.
17. Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM. Standardization of PSA determinations. *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 45-51.
18. Sershon PD, Barry MJ, Oesterling JE. Serum prostate specific antigen discriminates weakly between men with benign prostatic hyperplasia and patients with organ-confined prostate cancer. *Eur Urol* 1994; 25: 281-287.
19. Wolff JM, Scholz A, Boeckmann W, Jakse G. Differentiation of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer employing prostatic specific antigen density. *Eur Urol* 1994; 25: 295-298.
20. Akdas A, Dillioglugil O, Cevik I, Ilker Y. Impact of prostate specific antigen density in benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma. *Eur Urol* 1994; 25: 299-303.