

## PSA ciągle najlepszy marker nowotworowy, modyfikacje testu i nowe markery raka stercza

PSA still the best cancer marker, PSA test modifications and new prostate cancer markers

Michał Braczkowski<sup>1</sup>, Michał Białożyty<sup>2</sup>, Ryszard Braczkowski<sup>3,4</sup>,  
Zdzisława Kondera-Anasz<sup>5</sup>

### STRESZCZENIE

<sup>1</sup> Wyższa Szkoła Medyczna w Sosnowcu  
<sup>2</sup> Szpital im. Prof. E. Michałowskiego w Katowicach  
<sup>3</sup> Katedra Zdrowia Publicznego Wydziału Zdrowia Publicznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
<sup>4</sup> Oddział Chorób Wewnętrznych, Autoimmunologicznych i Metabolicznych Centralnego Szpitala Klinicznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
<sup>5</sup> Katedra i Zakład Immunologii i Serologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Od wielu lat specyficzny antygen sterczowy (PSA) uważany jest za najlepszy, choć daleki od ideału marker nowotworowy. Podstawowy cel jego zastosowania to pomoc w rozpoznawaniu i różnicowaniu raka i łagodnego przerostu gruczołu krokowego. Wartość markerów nowotworowych w przypadku raka stercza jest szczególnie ważna wobec faktu wieloletniego bezobjawowego rozwoju tego nowotworu, a szczególnego znaczenia nabiera ona w ostatnich latach, gdy obserwujemy stale wzrastającą tendencję do zachorowań. W pracy przedstawiono zalety i wady testu PSA, jego modyfikacje (np. testy dynamiczne) wprowadzone w celu zwiększenia czułości i specyficzności oraz – co za tym idzie – wiarygodności testu. W dalszej kolejności opisano proenzymy oraz formy prekursorowe PSA i możliwości wykorzystania ich w diagnostyce. W drugiej części pracy opisano nowe, potencjalne markery raka stercza, których próby wprowadzenia wiążą się z rozwojem technik biologii molekularnej. Należy tu wymienić kolejne kalikreiny (PSA jest także przedstawicielem tej rodziny), EPCA-2, PCA3, AMACR, produkty rearanzacji i fuzji genów, hipermetylacja GSTP1, wolne DNA w surowicy krwi, przeciwciała i szereg innych o nieco mniejszym znaczeniu.

### ADRES

**DO KORESPONDENCJI:**  
Dr hab. n. med. Ryszard Braczkowski  
Katedra Zdrowia Publicznego  
Wydziału Zdrowia Publicznego  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Piekarska 18  
41-902 Bytom,  
tel. 32 397 65 32 do 5  
e-mail: rbracz@sum.edu.pl

### SŁOWA KLUCZOWE

markery nowotworowe, rak stercza, łagodny przerost stercza, PSA, nowe markery raka stercza, biologia molekularna

### ABSTRACT

The prostate-specific antigen is considered to be the most effective, though far from ideal, tumor marker. The basic aim of its application is to diagnose and differentiate between cancer and benign prostatic hyperplasia. The value of markers in case of prostate cancer is of particular importance, because of the long-term asymptomatic development. And recently,

these values have become even more significant, since there has been an increasing tendency to suffer from the disease. Our study presents advantages and imperfections of the PSA test, its modifications (e.g. dynamic tests) introduced in order to increase the specificity and sensitivity of the test, and thus its reliability. Subsequently proenzymes and PSA precursor forms as well as the opportunities for their use in the diagnostics are described. The rest of the article is devoted to the description of new potential prostate cancer markers, the implementation of which is closely associated with the development of molecular biology techniques. Among them the most important are: new kallikreins (PSA is also the member of kallikreins family), EPCA-2, PCA3, AMACR, products of gene fusion and rearrangements, GSTP1 hypermethylation, free non-cellular DNA and some antibodies.

#### KEY WORDS

cancer markers, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, new prostate cancer markers, molecular biology

Pomimo prowadzonych od dawna kosztownych badań oraz ogłoszenia setek doniesień, postęp w zakresie markerów nowotworowych nie jest tak duży, jak tego się wcześniej spodziewano i ciągle daleka jest jeszcze droga do wykrycia markera idealnego, charakteryzującego się wysoką czułością, swoistością i wartością predykcyjną [1]. Od wielu lat za najlepszy, choć daleki od ideału marker nowotworowy uważany jest specyficzny antygen sterczowy (*prostate-specific antigen* – PSA). Wartość markerów nowotworowych w przypadku raka stercza jest szczególnie ważna z uwagi na wieloletni bezobjawowy rozwój tego nowotworu. Szczególnego znaczenia problem ten nabiera w ostatnich latach, gdy obserwujemy stale wzrastającą tendencję do zachorowań [2,3].

#### 1. PSA

PSA jest glikoproteiną, którą z tkanki gruczołu krokowego po raz pierwszy wyizolowali w 1979 r. Wang i wsp. [4]. Początki badań nad tą substancją notowane są już od roku 1971, kiedy to Hara i wsp. wykryli w ludzkim nasieniu białko, zakwalifikowane przez nich do grupy gamma-seminoprotein. Kolejne badania doprowadziły do wykazania przez Pepsidero i wsp. jego obecności w krwi [5]. Gen odpowiedzialny za produkcję tego białka zlokalizowany jest na chromosomie 19 (19q13.4). W surowicy PSA występuje głównie w formie związanej, tworząc kompleks z  $\alpha_1$ -antychymotrypsyną (PSA-ACT), która stanowi 65–95% PSA całkowitego. W mniejszej ilości występują kompleksy z  $\alpha_2$ -makroglobuliną ( $A_2M$ ) i inhibitorem  $\alpha_1$ -antyproteazy (API). W niewielkich

ilościach występuje w postaci wolnej (fPSA) [6,7,8]. Wynik PSA oznacza stężenie PSA całkowitego (tPSA), w skład którego wchodzi PSA wolne i związane. Proteina produkowana jest zarówno przez komórki zdrowego gruczołu krokowego, jak i przez komórki raka tego narządu. Ponadto w śladowych ilościach jest on produkowany poza gruczołem krokowym (ślinianki, endometrium). Jego fizjologiczna funkcja to udział w trawieniu białek będących składnikami płynu nasiennego, co powoduje upłynnienie nasienia.

Zastosowanie PSA w diagnostyce jako markera raka gruczołu krokowego wynika z tego, że w przypadku zachorowania jego stężenie we krwi zwykle wzrasta, co nie jest konsekwencją jego zwiększonej produkcji, lecz zmiany sposobu wydzielania, w efekcie którego u chorych przedostaje się do krwi znacznie większa ilość PSA. Za prawidłowe uznaje się stężenie PSA we krwi mieszczące się w granicach 0,0–4,0 ng/ml.

Mimo licznych zalet, PSA nie jest specyficznym markerem raka gruczołu krokowego. Jak już wskazuje sama nazwa, specyficzność dotyczy raczej samego gruczołu krokowego niż jego nowotworu. Do wzrostu stężenia PSA we krwi dochodzi także w przypadku łagodnego przerostu stercza (BPH) oraz w przypadku zapalenia gruczołu. Wpływ na wynik oznaczania PSA mają: podawanie androgenów, finasterydu i leków z grupy blokerów kanału wapniowego, a także zabieg cystoskopii oraz – w mniejszym stopniu – badanie *per rectum* i cewnikowanie pęcherza moczowego. Wynik badania stężenia PSA zależy ponadto od stosowanej metody – różnorodność metod i używanych zestawów

do oznaczeń mogą być przyczyną nieporównywalności wyników z różnych ośrodków.

Stężenia PSA w osoczu oznacza się metodami radioimmunologicznymi i enzymoimmunologicznymi. W obu technikach wykorzystuje się reakcje między antygenem a przeciwciałem. Zależnie od producenta, stosowane są zestawy z przeciwciałem poli- lub monoklonalnym. W ostatnich latach coraz częściej używane są także testy chemiluminescencyjne CMIA z użyciem mikrocząstek i znacznika. Można też już dziś znaleźć oferty firm, proponujących zakup testu PSA do indywidualnego zastosowania. Za pomocą rutynowo stosowanych testów (*total PSA*) oznacza się zawsze PSA-ACT oraz, w zależności od rodzaju testu, zmienną ilość wolnego PSA.

W wielu pracach akcentowana jest także zależność stężenia PSA we krwi od wieku badanego. Zdaniem Osterlinga i wsp., u osób poniżej 40 roku życia za normę należy przyjąć wartość do 2,5 ng/ml, a powyżej 70 lat górna granica normy powinna wynosić 6,6 ng/ml [9,10].

W sukurs sceptykom przyszły badania epidemiologiczne. Wynika z nich, że wprowadzenie oznaczania PSA jako badania przesiewowego doprowadziło do nadrozpoznowalności raka gruczołu krokowego i często do wykonywania niepotrzebnej biopsji [11]. Jednocześnie wykazano, że u około 29,6% pacjentów z wartością PSA między 3,1 a 4,0 ng/ml, przy której nowotwór nie powinien być rozpoznany, stwierdzało się jednak jego obecność po wykonaniu biopsji, co więcej wykrywano go także u 10,1% pacjentów z PSA między 0,6 a 1,0 ng/ml [12]. Inne badanie epidemiologiczne, w ramach którego przebadano 18 882 mężczyzn bez rozpoznanego w chwili rozpoczęcia badania raka gruczołu krokowego, także wykazało niską wrażliwość testu, gdy jako punkt odcięcia przyjęto wartość 4,0 ng/ml. W tej sytuacji wykryto jedynie 20% raków, 80% pozostało nierozpoznane [13].

Jeden z najtrudniejszych problemów w diagnostyce raka gruczołu krokowego wiąże się z sytuacją, gdy stężenie PSA mieści się w granicach tzw. szarej strefy, czyli między 4 a 10 ng/ml. W około 25% takich przypadków stwierdza się obecność raka, dlatego wynik taki powinien być traktowany jako wskazanie do wykonania biopsji [14].

Potencjalny, zniekształcający wynik badania PSA, wpływ kolejnych czynników jest tak prosty, że należałoby się dziwić, że podniesiony został dopiero niedawno. Są nimi masa

i wzrost badanego. Czynniki te mogą wpływać na stopień rozcieńczenia wydzielanego przez stercz białka, przez co np. wynik badania u osób wysokich i otyłych mógłby być zaniżony [15,16].

Najnowsze badania dotyczące czułości testu PSA przytaczane przez badaczy z European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer wskazują, że zależy ona od ośrodków i rejonów prowadzących badania i jest mniejsza w testach wykonywanych w USA niż w Europie [17].

Przytoczone tu obserwacje nie negują wartości oznaczania PSA we wczesnej diagnostyce i monitorowaniu leczenia raka stercza, zwracają jednak uwagę na ostrożność w interpretacji wyników.

## 2. MODYFIKACJE TESTU

W celu zwiększenia możliwości wykorzystania PSA w diagnostyce zaczęto wprowadzać kolejne testy, będące modyfikacją lub rozszerzeniem tego badania. Ich podstawowym celem jest rozróżnienie, czy podwyższone stężenie PSA wynika z przerostu, czy z raka stercza.

### 2.1. PSA DENSITY

Jako jedno z pierwszych wprowadzono oznaczanie tzw. PSA density (PSAD), czyli odniesienie stężenia PSA do objętości gruczołu krokowego oznaczonego za pomocą odbytniczego badania USG (TRUS) [18,19]. Przydatność tej modyfikacji testu została m.in. wykazana w jednym z polskich badań [20]. Seaman i wsp. zaproponowali, aby u pacjentów ze stężeniem PSA w granicach 4–10 ng/ml i negatywnym wynikiem biopsji przyjąć wartość PSAD 0, > 15 ng/ml/g, jako wskazującą na prawdopodobieństwo raka [21]. Niestety, konieczność wykonywania nie zawsze dostępnego TRUS ogranicza możliwość rozpowszechnienia tego testu. Wskazywano także na inne możliwe błędy w efekcie zastosowania tego testu. Catalona i wsp. przedstawili np. wyniki obserwacji, w której stwierdzili, że zastosowanie wartości 0,15 jako punktu odcięcia powoduje, że u pacjentów z wynikiem testu PSA w krwi między 4 a 10 ng/ml i negatywnym wynikiem badania *per rectum* często istniejący rak pozostaje nierozpoznany [22].

### 2.2. PSA IN TRANSITION ZONE

Jako lepszą alternatywę zaproponowano badanie PSA w tzw. strefie przejściowej (*PSA in*

*transition zone* – PSAT) [23,24]. Lecz i temu badaniu przedstawiono wiele zarzutów, np. że w przypadku małego gruczołu krokowego identyfikacja strefy przejściowej jest trudna i nieprecyzyjna, a dodatkowo w małych gruczołach przerost hipertroficzny jest mniejszy, co przyczynia się do mniejszej strefy przejściowej. W efekcie daje to wyższą wartość PSAT, przez co niweluje się różnica między łagodną a złośliwą postacią rozrostu [25].

### 2.3. BADANIA DYNAMICZNE

Kolejną modyfikacją zastosowania oznaczania PSA w diagnostyce raka stercza są badania dynamiczne, u podstawy których leży ocena tempa narastania stężenia PSA w krwi. Są to PSAV (*PSA-velocity*), definiowane jako absolutny roczny przyrost osoczowego PSA (ng/ml/rok), i opracowany przez urologów z Uniwersytetu Stanford czas podwojenia PSA (*PSA doubling time* – PSADT) [26,27].

W ostatnich latach jako wartość mogącą stanowić wskazanie do biopsji przy PSA powyżej 4 ng/ml przyjęto 0,75 ng/ml/rok. Dla niższych stężeń PSA określenie punktu odcięcia PSAV jest trudniejsze, najczęściej przyjmowana jest wartość między 0,1 a 0,5 ng/ml/rok [28,29]. Badanie PSAV zaakceptowane zostało przez wiele ośrodków, jednak ciągle jeszcze pojawiają się wyniki podważające jego znaczenie [30]. Badanie PSADT różni się od PSAV tym, że, określa ono wykładniczy wzrost osoczowego PSA w czasie. Wylicza się je z wzoru:

$$PSADT = \log 2 \times t / [\log wkPSA - \log wp PSA]$$

gdzie: t = czas między dwoma oznaczeniami, wp = wartość początkowa, wk = wartość końcowa oznaczania PSA.

Zaletą tego badania jest to, że jeśli w kolejnych badaniach użyty został taki sam zestaw, to jego wynik nie zależy od metody [31].

### 2.4. PSA WOLNE, PSA CAŁKOWITE

W ostatnich latach coraz większą wagę zaczęto przypisywać oznaczaniu frakcji PSA wolnego i związanego oraz proporcji PSA wolne/PSA całkowite. Aby mówić o tym badaniu, należy wrócić do pierwszych fragmentów pracy i przypomnieć, że w osoczu PSA występuje w postaci wolnej i związanej. Okazuje się, że poziom PSA tworzącego kompleks z  $\alpha$ 1-chymotrypsyną u chorych z rakiem jest wyższy niż u chorych z łagodnym przerostem stercza. Jak już wspomniano, znacznie mniejsza ilość

PSA występuje w postaci wolnej. Odkryto, że procentowa zawartość PSA wolnego ulega dalszemu zmniejszeniu w raku tego narządu [32]. Badanie stosunku wolnego do całkowitego PSA (*free/total PSA ratio*) ma szczególne znaczenie u pacjentów z zawartością PSA w osoczu na poziomie 4–10 ng/ml oraz z negatywnym wynikiem badania *per rectum*, co potwierdziły wielośrodkowe badania prowadzone przez Catalonę i wsp. [33]. Niestety, tak jak we wcześniej prezentowanych testach, istnieje wiele czynników (np. temperatura przechowywania próbek czy wielkość gruczołu krokowego), które mogą wpływać na wynik badania [34].

W zwykłych warunkach nie można wybiórczo oznaczyć PSA związanego. Jest to jednak możliwe przy zastosowaniu przeciwciał, które zapobiegają przyłączeniu się PSA wolnego do oznaczanego kompleksu – oznaczamy wówczas tzw. cPSA (PSA związane – lepiej używać byłoby nazwy PSA skompleksowane lub kompleksowe) [35]. W niektórych doniesieniach wskazywana jest możliwość zastąpienia oznaczania stosunku fPSA/tPSA przez oznaczanie cPSA /tPSA [36,37,38]. Od kilku lat możliwe jest oznaczanie PSA związanego z  $\alpha$ <sub>2</sub>-makroglobuliną, są nawet prace wskazujące na dużą wartość takiego oznaczenia, gdyż ilość PSA A<sub>2</sub>M jest znacznie wyższa w łagodnym przerście stercza niż w raku [39]. Obecnie brak jednak komercyjnych testów umożliwiających to badanie.

### 2.5. FORMY WOLNEGO PSA

Fracją niejednorodną jest także fPSA złożona z co najmniej trzech form – pPSA, bPSA (BPSA) oraz iPSA. Forma pPSA (lub proPSA) to proenzym lub forma prekursorowa PSA, zawierająca 7 aminokwasów dla peptydu wiodącego. Występują też formy skrócone [-2]proPSA i [-4]proPSA, [-5]proPSA [40,41,42,43,44]. Paradoksalnie w raku gruczołu krokowego spadkowi wartości fPSA towarzyszy wzrost wartości pPSA. Zdaniem niektórych badaczy, pPSA różnicuje raka gruczołu krokowego od jego przerostu lepiej niż PSA wolne i skompleksowane, szczególnie w przypadkach, gdy całkowite PSA zawiera się w granicach 4–10 µg/l [40] lub gdy procent wolnego PSA jest mniejszy niż 15 [41]. Według Mikołajczyka i wsp., jeszcze bardziej wartościowe jest oznaczanie [-2]proPSA [42]. Forma bPSA wykazuje w porównaniu z poprzednią nieznaczne różnice w budowie łań-

cucha aminokwasowego [45]. Zawartość bPSA w surowicy krwi wzrasta w łagodnym gruczolakowatym przerzucie gruczołu krokowego (b – *benign*) [46]. Trzecia z tych molekularnych subform fPSA to nieaktywna enzymatycznie forma, tzw. *intact PSA* (iPSA). Forma ta także znalazła się w kręgu zainteresowania badaczy zainteresowanych możliwością jej wykorzystania w praktyce [47].

Czas pokaże, czy wszystkie możliwości testu PSA zostały już wyczerpane, czy też pojawiają się kolejne jego modyfikacje. Już dziś wiadomo, że nie wszystkie próby udoskonalenia PSA znalazły uznanie i rozpowszechniły się. Przykładem może tu być bardzo obiecująco zapowiadające się badanie stosunku PSA we krwi do PSA w moczu, zaproponowane przez Iraniego i wsp. [48]. Najbliższe lata pokażą również, czy oznaczanie PSA pozostanie badaniem wiodącym, gdyż pojawiły się nowe bardzo interesujące propozycje.

### 3. INNE KALIKREINY

PSA jest przedstawicielem rodziny ludzkich kalikrein (hK), w której – jak do tej pory – udało się zidentyfikować 15 przedstawicieli o podobnej sekwencji DNA i zbliżonym składzie aminokwasowym [6]. W piśmiennictwie anglojęzycznym używana jest też nazwa *kalikrein related peptidase* [49]. Geny dla wszystkich tych białek, określane jako KLK, znajdują się w lokalizacji 19q13.4. Gen KLK1 określany jest jako gen kalikreiny trzustkowo/nerkowej. PSA kodowany jest przez gen KLK3. W diagnostyce raka gruczołu krokowego próbuje się wykorzystać także inne kalikreiny, wśród których największe nadzieje budzą kalikreiny 2 oraz 11, kodowane przez geny KLK2 i KLK11 [50]. Kalikreina 2 wykazuje znaczny stopień homologii z PSA, na poziomie aminokwasowym wynoszący 78%, a na poziomie sekwencji nukleotydów w genie nawet 80%. W raku gruczołu krokowego obserwuje się znaczący wzrost stężenia kalikreiny 2 w surowicy krwi, co stwierdza się nawet w przypadkach niskiego stężenia PSA [51].

Kwiatkowski i wsp. jako pierwsi zaobserwowali, że stosunek stężenia kalikreiny 2 do fPSA bardzo dobrze różnicuje raka gruczołu krokowego od jego przerostu, zarówno u badanych z PSA na poziomie 2–4 µg/l, jak i na poziomie 4–10 µg/l [52]. Zdaniem wielu badaczy, dużą zaletą kalikreiny 2 jest to, że jej poziom koreluje ze stopniem rozwoju choroby [53,54,55].

Kolejną kalikreina, która może w przyszłości znaleźć zastosowanie w uzupełniającej diagnostyce raka gruczołu krokowego, jest kallikreina 11 (gen zapisywany jest jako KLK11, a białko hK11) [56]. Ekspresja genu stwierdzana jest w szeregu tkanek, jak np. w mózgu, skórze, żołądku, jelicie grubym. Podwyższony poziom hK11 we krwi stwierdza się zarówno w raku, jak i gruczolaku gruczołu krokowego, jednak stężenie w gruczolaku jest zdecydowanie wyższe, dlatego obliczanie stosunku hK11/tPSA postulowane jest jako bardzo przydatny wskaźnik różnicujący [57].

### 4. STERCZOWY ANTYGEN ŚLUZOWY

Pierwsze informacje o nowym, bardziej specyficznym od PSA biomarkerze dotyczyły sterczowego antygeny śluzowego [58]. Należy on do grupy stosowanych już w praktyce klinicznej antygenów śluzowych, takich jak: MUC1, CEA czy M344, lecz nie wykazuje z nimi reakcji krzyżowej [50]. Nie pojawiło się jednak zbyt wiele doniesień mogących zachęcić do jego zastosowania.

### 5. IGF-1

W raku gruczołu krokowego opisywane jest podwyższone stężenie insulinopodobnych czynników wzrostu (IGFs) oraz obniżone stężenie IGFBP3, głównego białka wiążącego IGF-1 w surowicy krwi chorych [59]. Zmiany takie opisywane są także w innych nowotworach, co pozwala przypuszczać, że szanse, aby ocena ich stężenia we krwi mogła być badaniem pomocnym w rozpoznaniu raka gruczołu krokowego, są niewielkie, ale być może stanie się ona przydatna w ocenie efektów leczenia.

### 6. BIAŁKA, PEPTYDY, GENY

Postęp, jaki w ostatnich kilkunastu latach obserwowany jest w takich dziedzinach, jak genomika (szczególnie rozpowszechnianie się badań z zastosowaniem mikromacierzy) i proteomika, wskazał na możliwość wykorzystania kolejnych białek i peptydów jako markerów nowotworowych. Różnice w ekspresji w tkance zdrowego gruczołu krokowego, gruczołu który uległ łagodnemu przerostowi oraz w złośliwej tkance nowotworowej, wykazują m.in.: wczesny antygen raka stercza (*early prostate antigen* – EPCA),  $\alpha$ -metylacyl CoA racemaza (AMACR) oraz PCA3 [50]. Do listy tej należałoby także dodać małe białka

wiążące integrynę [60]. Zmiany w ekspresji genów często przyczyniają się do zmian stężenia we krwi białek będących produktami tych genów. Postęp oznacza nie tylko możliwość badania kolejnych genów i białek, ale także praktyczne wykorzystanie możliwości badania fuzji genów czy też oceny zmian epigenetycznych, takich jak np. występowanie hipermetylacji.

#### 6.1. EPCA-2

EPCA (*early prostate cancer antygen*) jest białkiem strukturalnym jądra komórkowego, opisanym po raz pierwszy przez naukowców z John's Hopkins University [61]. Jako pierwsze opisano EPCA-1, które okazało się markerem służącym do oceny materiału uzyskanego w czasie biopsji. W następnej kolejności odkryto we krwi białko EPCA-2, zbliżone budową do EPCA-1. Wspomniani badacze z John's Hopkins University opracowali testy ELISA służące do wykrywania w krwi EPCA-2, a konkretnie jego epitopów EPCA-2.19 oraz E-PCA-2.22 [65,66]. Ich specyficzność zbliżona jest do 97% i pozwalają one wykrywać 97% wszystkich raków gruczołu krokowego, ponadto stężenie EPCA-2.22 może być powiązane z rozległością procesu nowotworowego. Marker ten doczekał się już prób wprowadzania na rynek.

#### 6.2. AMACR

AMACR jest enzymem zaangażowanym w procesy metabolizmu oksydacyjnego i biosyntezę bocznych łańcuchów kwasów tłuszczowych. Odkryty został w mięsie i produktach mlecznych [67]. Gen kodujący ten enzym umieszczony jest w regionie 5p13.3. Metaanaliza badań przeprowadzonych przy użyciu mikromacierzy wykazała jego nadekspresję w tkance raka gruczołu krokowego [68]. Zastosowanie przeciwciał przeciw AMACR do badania immunohistochemicznego pozwala rozróżnić zmianę złośliwą w gruczole krokowym od łagodnego przerostu na poziomie 97% czułości i 92% specyficzności [69]. Biorąc to pod uwagę zaczęto rozważać możliwość oznaczania AMACR w płynach ustrojowych. Wykazano możliwość oznaczania mRNA AMACR we krwi i moczu. Białko, jak dotąd, udaje się oznaczać tylko w moczu techniką western blot. Atrakcyjność wykorzystania AMACR w diagnostyce zwiększa dodatkowo możliwość oznaczania przeciwciał antyA-MACR [70]. Wyższe stężenie tych przeciwciał

w raku niż w łagodnym przeroście, wykazywana ze specyficznością 62% i wrażliwością 72%, zachęca do prób rozszerzenia diagnostyki także o ten parametr.

#### 6.3. PRODUKTY REARANŻACJI I FUZZI GENÓW

W wielu nowotworach stwierdzana jest rearanżacja i fuzja genów. Najlepiej zjawisko to zostało poznane i opisane w przypadku białaczek i chłoniaków. Rearanżacje genów obserwowane są także w raku gruczołu krokowego. Najlepiej znana jest chromosomalna translokacja umiejscowionego w pozycji 21q22.3 genu kodującego zakotwiczoną w błonie komórkowej proteazę serynową 2 (TMMPRSS2), pełniącą funkcję regulatora androgenów, i jego fuzja z genem dla czynnika transkrypcyjnego ERG o lokalizacji 21q22.2 lub z genem ETV1 (*ets variant 1*) [50]. Powstałe w wyniku tych fuzji geny noszą nazwy odpowiednio TMMPRSS2:ERG i TMMPRSS2:ETV1. Spotykane są w około 50–60% raków gruczołu krokowego i jedynie w pojedynczych przypadkach w łagodnym przeroście tego narządu [70]. Opracowany już został test wykrywający za pomocą amplifikacji genu i następnie ilościowego PCR, obecność fuzyjnego TMMPRSS2:ERG w moczu pobranym po masażu gruczołu krokowego [71]. Ponieważ opisane fuzje genów odgrywają najprawdopodobniej istotną rolę w rozwoju raka gruczołu krokowego, niewykluczone, że znajdą większe zastosowanie jako punkty, na które ukierunkowana będzie terapia celowana, niż jako markery tego nowotworu [72]. W rakach gruczołu krokowego, w których nie dochodzi do rearanżacji genów ERG, obserwowana jest natomiast nadekspresja genu SPINK1 [73]. Nadekspresję tę stwierdzono także w wielu innych nowotworach. W przypadku raka gruczołu krokowego istnieje możliwość jego oznaczania w moczu.

#### 6.4. PCA3

W ostatnich latach coraz bardziej rozpowszechnia się oznaczenie PCA3, określanego też DD3(PCA3). Poprzez badanie ekspresji PCA3 rozumiemy oznaczanie obecności niekodującego mRNA, będącego produktem genu PCA3 (*prostate cancer gene 3*) [74]. Jest ona stwierdzana w 95% raków stercza. Gen podlega w nich mechanizmowi *up regulation*. Zjawiska tego nie stwierdza się w przypadku KLK3. Ekspresja genu PCA3 nie jest stwierdzana w żadnej innej tkance ani narządzie poza gruczołem krokowym, włączając jądra i pęcherz

moczowy [75]. Szczególnie interesująca jest możliwość oznaczania ekspresji PCA3 RNA w moczu [75,76,77]. Za pomocą dostępnych już na rynku testów komercyjnych wynik przedstawiany jest jako stosunek ekspresji PCA3 RNA do ekspresji PSA mRNA. Ten ostatni fakt może budzić pewne zastrzeżenia, lecz mimo to wskazuje się na wysoką czułość i specyficzność tego markera [78]. Wydaje się, że dzięki tym dwóm cechom marker PCA3 nie powinien pozostać tylko interesującą propozycją, lecz stać się istotnym elementem diagnostyki raka gruczołu krokowego.

Istnieje już możliwość równoczesnego oznaczania kilku markerów molekularnych za pomocą badania opartego na zasadzie PCR multiplex [79,80]. Wiodącym markerem jest tu oczywiście PCA3, ale badania uzupełniają AMACR, TFF3, GOLPH2, SPINK1 i TMMPRSS2:ERG. Należałoby też wspomnieć o uzupełniających ten multiplexowy test badaniach TFF3, GOL-PH2.

#### 6.5. TFF3

TFF3 należy do rodziny małych peptydów (*trefoil factors*) powiązanych z wydzielaniem śluzu przez komórki nabłonka, których rola polega na ochronie śluzówki [81]. Nazwa pochodzi od zawartych w budowie tego peptydu trzech pętli przypominających trójlistną koniczynę. Nadekspresja genu TFF1 wykazana została w raku piersi, natomiast nadekspresję genu TFF3 (*intestinal tefoil factor*) stwierdzono techniką mikromacierzy w tkance raka gruczołu krokowego. Podwyższone stężenie tego peptydu wykonano w surowicy krwi chorych z rakiem gruczołu krokowego [82].

#### 6.6. GOLPH2

Ekspresja GOLPH2 (*Golgi phosphoprotein 2*) została wykryta w tkance nowotworowej raka gruczołu krokowego, a później także w surowicy krwi. Wartość GOLPH2 jako markera raka gruczołu krokowego porównywana jest z wartością AMACR [83].

#### 7. HIPERMETYLACJA GSTP1

Gdy na początku naszego wieku opublikowano prace mówiące o zsekwencjonowaniu ludzkiego genomu, wydawało się, że rozwiązany zostanie całkowicie zarówno problem dziedziczenia, jak i powstawania wielu chorób. Wkrótce jednak okazało się, jak złudne

to były nadzieje, głównie z powodu zmian zachodzących w genach, takich jak np. metylacja cytozyny czy potranslacyjne modyfikowanie histonów. Zjawiska epigenetyczne próbuje się również wykorzystać w celach diagnostyki i prognozowania nowotworów. Jednym z nich jest hipermetylacja wysp dwunukleotydów cytozynowo-guaninowych (CpG) [84]. W warunkach fizjologicznych 70% CpG ma grupę metylową przyłączoną do cytozyny. Istnieją jednak sekwencje DNA, zwane wyspami CpG, które nie ulegają w warunkach fizjologicznych metylacji na końcu 5' regionów promotorowych genów. Sytuację, w których zmetylowane CpG pojawiają się w tych regionach, mogą skutkować zahamowaniem transkrypcji, brakiem ekspresji odpowiadających genów i utratą funkcji odpowiednich produktów tych genów. Zjawisko to określane jest jako „wyciszenie genu w procesie metylacji”. Gdy zaczyna ono dotyczyć genów supresorowych, czyli tych, których prawidłowe produkty ograniczają tempo podziałów komórkowych, może przyczyniać się do onkogenezy. Zjawisko to występuje w wielu nowotworach. W raku gruczołu krokowego hipermetylacja wysp CpG obserwowana jest w rejonie promotorowym genu S-transferazy glutationowej  $\pi$  (GSTP1). Produktem tego genu jest enzym uczestniczący w detoksykacji różnych związków, w tym karcinogenów. Jego wyciszenie może przyczyniać się do rozwoju raka gruczołu krokowego [85]. Hipermetylacja GSTP1 badana w osadzie moczu pobranego po masażu gruczołu krokowego przez odbyt może być markerem tego nowotworu [86].

#### 8. WOLNE DNA

Zainteresowanie badaczy wzbudziło nie tylko DNA stanowiące podstawę procesu transkrypcji zachodzącej w komórce. Zaobserwowano, że w osoczu krwi chorych na niektóre nowotwory stwierdzane jest wolne (pozakomórkowe) DNA. Informację na ten temat po raz pierwszy przedstawiono w 1948 r. [87], jednak o związku między występowaniem wolnego DNA we krwi a chorobami nowotworowymi nie mówiło się do 1977 r., do opublikowania pracy Leona i wsp. [88]. Obecność wolnego DNA we krwi wykazana została m.in. w raku płuc i raku jelita grubego [89,90], a także w raku gruczołu krokowego [91]. Badanie to budzi ciągle wiele wątpliwości, takich jak technika badania (ostatnio preferowane ilościowe RT-PCR, chociaż nie brak zwolenników innych

wcześniej stosowanych w tym badaniu technik) czy materiał do badania (lepsze osocze czy surowica). Nie zmienia to jednak faktu, że wiąże się z nim bardzo duże nadzieje.

#### 9. PRZECIWCIAŁA

Przy opisywaniu AMACR wspomniano o możliwości wykorzystania oznaczania przeciwciał przeciw temu enzymowi jako jednemu z biomarkerów. W podobnym celu można wykorzystać także inne autoprzeciwciała [50,92]. Wśród nich duże nadzieje wiązać można z przeciwciałami przeciw HIP1 (*huntingtin interacting protein*) [93].

#### 10. NOWE MARKERY CZY JEDNAK PSA?

Pomimo przedstawionej tu dużej liczby badań, które uzupełniać mogą oznaczanie PSA, podkreślić należy, że nie wyczerpują one wszystkich możliwości. Ciągłe jednak PSA pozostaje badaniem wiodącym. Pojawiają się zresztą opinie poddające w wątpliwość wprowadzanie na rynek testów, których wartość nie przewyższa wartości oznaczania PSA [94], choć nie

zatrzyma to działań zmierzających do rozpoznań testów już istniejących oraz badań w kierunku wykrycia nowych markerów.

#### 11. MARKERY PODATNOŚCI

Na koniec należałoby wspomnieć o jeszcze jednym nowym kierunku badań, których celem nie jest wczesne wykrycie nowotworu, lecz osób szczególnie zagrożonych zachorowaniem, co może się wiązać zarówno z występowaniem pewnych mutacji, jak i określonego polimorfizmu niektórych genów. W przypadku raka gruczołu krokowego zwiększone ryzyko zachorowania próbuje się powiązać z m.in. z polimorfizmem zlokalizowanego na chromosomie X (Xq11–12), genu receptora androgenowego czy też z polimorfizmem genu PSA [95,96] oraz z licznymi wariantami innych genów, np. genu ATM (*ataxia-teleangiectasia mutated*), czy też genów zlokalizowanych na chromosomie 8 w rejonie 8q24 [97,98]. Stale wzrastająca liczba prac dotyczących markerów podatności na zachorowanie pozwala przypuszczać, że to właśnie ich oznaczanie może w przyszłości stać się kierunkiem wiodącym.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Mcshane L.M., Altman D.G., Sauerbrei W., Taube S.E., Gion M., Clark G.M. Reporting recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). *J. Natl. Cancer. Inst.* 2005; 97: 1180–1184.
2. Hayat M.J., Howlander N., Reichman M.E., Edwards B.K. Cancer statistics, trends and multiple primary cancer analysis from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007; 12: 20–37.
3. Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Thun M.J. Cancer statistics 2007. *Ca Cancer. J. Clin.* 2007; 57: 43–46.
4. Wang M.C., Valanzuela L.A., Murphy G.P., Chu T.M. Purification of human prostate-specific antigen. *Invest. Urol.* 1979; 17: 159–163.
5. Pepsidero L.D., Kurijama M., Wang M.C. i wsp. Prostate antigen: a marker for prostate epithelial cells. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1981; 66: 37–42.
6. Yousef G.M., Diamandis E.P. Human, tissue kallikrein gene family: structure, function and association to disease. *Endocrine Rev.* 2001; 22: 184–204.
7. Lilja H., Christenson A., Dahlen U. i wsp. Prostate specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotripsin. *Clin. Chem.* 1991; 37: 1618–1625.
8. Stennman U.H., Leinonen J., Alfhan H., Ranniko S., Tuhkannen K., Alfhan O. Complex between prostate specific antigen and alpha-1-antichymotripsin, the major form prostate specific antigen in serum of patients with prostatic cancer. Assay of the complex improves sensitivity for cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 222–226.
9. Oesterling J.E., Jacobsen S.J., Chute C.G. i wsp. Serum prostate specific antigen in a community-based population of healthy man. Establishment of age specific reference ranges. *JAMA* 1993; 279: 860–864.
10. Oesterling J.E. Age-specific reference ranges for serum PSA. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335: 345–356.
11. Potter S.R., Partin A.W. Prostate cancer detection, staging and treatment of localised disease. *Sem. Roentg.* 1999; 34: 269–283.
12. Stennaman U.H., Abrahamsson P.A., Lilja H., Ekman P., Hammady F.C., Boccon-Gibbodi L. Prognostic value of serum markers for prostate cancer. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 2005; 2161–2181.
13. Thompson I.M., Pauler D.K., Goodman P.J. i wsp. Prevalence of prostate cancer among man with prostate specific antigen level  $\leq$  4ng per milliliter. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 2239–2246.
14. Ankerst D.P., Thompson I.M. Sensitivity and specificity of prostate-specific antigen for prostate cancer detection with high rates of biopsy verification. *Arch. Ital. Urol. Androl.* 2006; 78: 125–129.
15. Rohde D., Mihelcic V. Does plasmatic dilution influence the validity of PSA-tests. *Aktuelle Urol.* 2007; 38: 113–143.
16. Rundle A., Richards C., Neugut A.I. Body composition, abdominal fat distribution, and prostate-specific antigen test results. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009; 18: 33–36.
17. Wever E.M., Draisma G., Heijnsdijk E. i wsp. Prostate-Specific Antigen Screening in the United States vs in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer-Rotterdam. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2010; 102: 352–355.
18. Babaian R.J., Fritsle H.A., Evans R.B. Prostate-specific antigen and prostate gland volume, correlation and clinical application. *J. Clin. Lab. Anal.* 1990; 18: 112–116.
19. Benson M.C., Whang I.S., Pantuck A. i wsp. Prostate specific antigen density; Means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J. Urol.* 1992; 147: 815–816.
20. Kochańska-Dziurkiewicz A., Szewczyk W., Mielniczuk M., Kasperkiewicz K. Przydatność oznaczania surowiczego stężenia wolnej i całkowitej formy swoistego antygenu sterczowego (PSA) w zakresie



- stężenia PSA od 4,0 do 10,0 ng/ml w diagnostyce różnicowej łagodnego rozrostu i raka gruczołu krokowego. *Urol. Pol.* 1998; 51: 67–75.
21. Seaman E., Whang M., Olsson C.A., Katz A., Cooner W.H., Benson M.C. PSA density (PSAD), role in patient evaluation and management. *Urol. Clin. North. Am.* 1993; 20: 653–663.
  22. Catalona W.J., Richie J.P., DeKernion J.B. i wsp. Comparison of prostate specific antigen concentration versus prostate specific density in the early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J. Urol.* 1994; 152: 2031–203
  23. Kalish J., Cooner W.H., Graham S.D.jr. 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: 601–606.
  24. Zlotta A.R., Djavan B., Marberger M., Schulman C. Prostate specific antigen density of the transition zone: a new effective parameter for prostate cancer prediction. *J. Urol.* 1997; 157: 1315–1321.
  25. Schmid H-P., Priklér R., Sturgeon C.M., Semjonow A. Diagnosis of prostate Cancer – The Clinical use of prostate specific antigen. *EAU Update Series* 2003; 1: 3–8.
  26. Berger, A., Deibl M., Steiner H.B. i wsp. Longitudinal PSA changes in men with and without prostate cancer: assessment of prostate cancer risk. *Prostate* 2005; 64: 240–245.
  27. Catalona, , Loeb S. The PSA era is not over for prostate cancer. *Eur. Urol.* 2005; 48: 541–545.
  28. Smith D.S., Catalona W.J. Rate of change in serum prostate-specific antigen levels as a method for prostate cancer detection. *J. Urol.* 1994; 152: 1163–1167.
  29. Thompson I.M., Ankerst D.P., Chi C. i wsp. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2006; 98: 529–534.
  30. Wolters T., Roobol M.J., Bangma C.H., Schröder F.H. Is prostate specific antigen velocity selective for clinically significant prostate cancer in screening? European randomized study of screening for prostate cancer (Rotterdam). *Eur. Urol.* 2009; 55: 385–393.
  31. Schmid H-P., McMeal J.E., Staney T.A. Observation on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer* 1993; 71: 2031–2040.
  32. Stephan C., Jung K., Lein M., Diamandis A.P. PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. *Eur. J. Cancer* 2007; 43: 1918–1926.
  33. Catalona W.J., Partin A.W., Stawin K.M. i wsp. Use of percentage of free prostate specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease A prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998; 279: 1542–1547.
  34. Stephan C., Lein M., Jung K., Schnorr D., Loening S.A. The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate-specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. *Cancer* 1997; 79: 104–109.
  35. Brawer M.K., Mayer G.E., Letran J.L. Measurement of complexed PSA improves specificity for early detection of prostate cancer. *Urology* 1998; 52: 372–378.
  36. Mitchel I.D.C., Croal B.L., Dickie A., Cohen N.P., Ross I. 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; 162: 1549–1553.
  37. Djavan B., Remzi M., Zlotta A.R. i wsp. Complexed prostate specific antigen, complexed prostate specific antigen density of total and transition zone, complexed/total prostate-specific antigen ratio, free to total prostate-specific antigen ratio, density of total and transition zone prostate specific antigen; results of multicenter European trial. *Urology* 2002; 60(suppl): 4–9.
  38. Fillela X., Alcover J, Molina R., Corrla J.M., Carretero P., Balesta A.M. Measurement of complexed PSA in the differential diagnosis between prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Prostate* 2000; 42: 181–185.
  39. Zhang W.M., Finne P., Leinonen J., Salo J., Stenman U.H. Determination of prostate-specific antigen complexed to alpha(2)-macroglobulin in serum increase the specificity of free to total PSA for prostate cancer. *J. Urol.* 2000; 56: 267–272.
  40. Sokoll L.J., Chan D.W., Mikolajczyk S.D. i wsp. Proenzyme PSA for the early detection of prostate cancer in the 2,5 to 4,0 ng/ml total PSA range: preliminary analyses. *Urology* 2003; 61: 274–276.
  41. Khan M.A., Sokol L.J., Chan D.W. i wsp. Clinical utility of proPSA and „binign” PSA when percent free PSA is less than 15%. *Urology* 2004; 64: 1160–1164.
  42. Mikolajczyk S.D., Catalona W.J., Evans C.L. i wsp. Proenzyme forms of prostate-specific antigen in serum improve the detection of prostate cancer. *Clin. Chem.* 2004; 50: 1017–1025.
  43. Jansen F.H., Roobol M., Jenster G., Schröder F.H., Bangma C.H. Screening for prostate cancer in 2008: the importance of molecular subforms of prostate-specific antigen and tissue kallikreins. *Eur. Urol.* 2009; 55: 563–674.
  44. Tabarès G., Jung K., Reice J. i wsp. Free PSA forms in prostatic tissue and sera of prostate cancerpatients: analysis by 2-DE and western blotting of immunopurified samples. *Clin. Biochem.* 2007; 40: 343–350.
  45. Wang T.J., Slawin K.M., Rittenhouse H.G., Millar L.S., Mikolajczyk S.D. Benign prostatic hyperplasia-associated prostate-specific antigen (BPSA), shows unique reactivity with anti-PSA monoclonal antibodies *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 4040–4045.
  46. Canto E.I., Singh H., Shariat S.F. i wsp. Serum BPSA outperforms both total PSA and free PSA as predictor of prostatic enlargement in man without prostate cancer. *Urology* 2004; 63: 905–910.
  47. Nurmikko P., Petterson K., Piironen T., Huggoson J., Lilja H. Discrimination of prostate cancer from benign disease by plasma measurement of intact free prostate-specific antigen lacking an internal cleavage site at Lys<sup>145</sup> – Lys<sup>146</sup> *Clin. Chem.* 2001; 47: 1415–1423.
  48. Irani J., Milet C., Levillain P., Dore B., Begon M., Aubert J. Serum to-urinary prostate specific antigen ratio: its impact in distinguishing prostate cancer when serum prostate antigen level is 4 to 10 ng/ml. *J. Urol.* 1997, 157, 185–188.
  49. Partin A.W., Catalona W.J., Finlay J.A. i wsp. Use of human glandular kallikrein 2 in the detection of prostate cancer: preliminary analysis. *Urology* 1999; 54: 839–845.
  50. Sardana G., Dowell B., Diamandis E.P. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin. Chem.* 2006; 54: 1951–1960.
  51. Haese A., Graefen M., Steuber T. i wsp. Total and Gleason grade 4/5 cancer volumes are major contributors of human kallikrein 2, whereas free prostate-specific antigen is largely contributed by benign gland volume in serum from patients with prostate cancer or benign prostatic biopsies. *J. Urol.* 2003; 170: 2269–2273.
  52. Kwiatkowski M. K., Recker F., Piironen T. i wsp. In prostatism patients the ratio of human glandular kallikrein to free PSA improves discrimination between prostate cancer and benign hyperplasia within the diagnostic “gray zone” of total PSA 4 to 10 ng/ml. *Urology* 1998; 5: 360–365.
  53. Haese A., Becker C., Noldus J. i wsp. Human glandular kallikrein 2 a potential serum marker for predicting the organ confined growth of prostate cancer. *J. Urol.* 2000; 163: 149–157.
  54. Recker F., Kwiatkowski M.K., Piironen T. i wsp. Human glandular kallikrein as tool to improve discrimination of poorly differentiated and non organ-confident prostate cancer compared with prostate-specific antigen. *Urology* 2000; 55: 481–485.
  55. Stephan C., Jung K., Nakamura T., Yousef G.M., Kristiansen G., Diamandis E. P. Serum human glandular kallikrein 2 (hk2) for distinguishing stage and grade of prostate cancer. *Int. J. Urol.* 2006; 13: 238–243.
  56. Diamandis E.P., Okui A., Mitsui S. i wsp. Human kallikrein 11. *Cancer Res.* 2002; 62: 295–300.
  57. Nakamura T., Scorilas A., Stephan C., Jung K., Soosaipillai A.R., Diamandis E.P. The usefulness of serum human kallikrein 11 for discriminating between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Res.* 2003; 63: 6534 –6546.
  58. Beckett M.L., Wright G. L. jr. Characterization of a prostate carcinoma mucin like-antigen (PMA). *Int. J. Cancer* 1995; 62): 703–710.
  59. Yu H., Rohan H. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J. Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 1472–1489.
  60. Jain A., Mc Knight G.A., Fisher L.W. i wsp. Small integrin-binding proteins as

- serum markers for prostate cancer detection. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 5199–5207.
61. Getzenberg R.H., Pienta K.J., Huang E.Y. W., Coffey D.S. Identification of nuclear matrix proteins in the cancer and normal rat prostate. *Cancer Res.* 1991; 51: 6514–6520.
62. Paul B., Dhir R., Landsittel D, Hitchens M.R., Getzenberg R.H. Detection of Prostate Cancer with a Blood-Based Assay for Early Prostate Cancer Antigen. *Cancer Res.* 2005; 65: 4097–4100.
63. Dhir R., Vietmeier B., Arlotti J. i wsp. Early identification of individualas with prostate cancer in negative biopsies. *J. Urol.* 2004; 171: 1419–1423.
64. Lin D.W. Utility of novel tumor markers in the setting of elevated PSA. *Urol Oncol.* 2009; 27(3): 315–321.
65. Leman E.S., Cannon G.W., Trock B.J. i wsp. EPCA-2: Highly specific serum marker for prostate cancer. *Urology* 2007; 69: 714–720.
66. Leman E.S., Magheli A., Cannon G.W., Magold L., Partin A.W., Getzenberg R.H. Analysis of serum test for prostate cancer that detects a second epitope of EPCA-2. *Prostate* 2009; 69: 1188–1194.
67. Wanders R.J., Vreken P., Ferdinandusse S. i wsp. Peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 2001; 29: 250–267.
68. Rhodes D.R., Barette T.R., Rubin M.A., Ghosh D., Chinnaiyan A.M. Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 4427–4433.
69. Jiang Z., Wu C.L., Woda B.A., Iczkowski K.A. i wsp. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a multi-institutional study of a new prostate cancer marker. *Histopathology* 2004; 45: 218–225.
70. Sreecumar A., Laxman B., Rhodes D.R. i wsp. Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004; 96: 834–843.
71. Tomlins S.A., Rhodes D.R., Perner S. i wsp. Recurrent fusion of *TMPRSS2* and *ETS* transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644–648.
72. Laxman B., Tomlins S.A., Mehra R. i wsp. Noninvasive detection of *TMPRSS2*: *ERG* fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. *Neoplasia* 2006; 8: 885–888.
73. Jhavar S., Brewer D., Edwards S. i wsp. Integration of *ERG* gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer. *BJU Int.* 2009; 103: 1256–1269.
74. Bussemakers M.J.G., van Bokhoven A, Verhaegh G.W. i wsp. DD3; a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 1999; 59: 5975–5979.
75. Grokskopf J., Aubin S.M.J., Deras I.L. i wsp. Aptima PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 2006; 52: 1089–1095.
76. Hessels D., Gunnewiek J.K., van Oort I. i wsp. DD3<sup>PCA3</sup> based molecular urine analyses for the diagnosis of prostate cancer. *Eur. Urol.* 2003; 44: 8–15.
77. Tinzl M., Marberger M., Horvath S, Chypre C. i wsp. DD3PCA3 RNA analysis in urine – a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur. Urol.* 2004; 46: 182–187.
78. de-Kok J.B., Verhaegh G.W., Roelofs R.W. i wsp. DD3(PCA3) a very specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 2002; 62: 2695–2698.
79. Laxman B., Morris D.S., Yu J. i wsp. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 68: 645–649.
80. Ouyang B., Bracken B., Burke B., Chung E., Liang J., Ho S.M. A duplex quantitative polymerase chain reaction assay based on quantification of alpha-methylacyl-CoA racemase transcripts of Prostate Cancer Antigen 3 in urine sediments improved diagnostic accuracy for prostate cancer. *J. Urol.* 2009, 181, 2508–2513.
81. Hoffmann W., Jagla W., Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol. Histopathol.* 2001; 16: 319–334.
82. Vestergaard EM, Borre M, Poulsen SS, Nexf E, Triring N Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 807–812.
83. Kristiansen G., Fritzsche F.R., Wassermann K. i wsp. GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue based diagnostics. *Br. J. Cancer* 2008; 99: 939–948.
84. Verma M., Srivastava S. Epigenetyka nowotworów: implikacje dla wczesnego wykrywania i zapobiegania. *Lancet Oncol.* (PL) 2003; 2: 121–131.
85. Jerónimo C., Usadel H., Henrique R. i wsp. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001; 93: 1747–1752.
86. Roupert N., Hupertan V., Yates D.R. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 1720–1725.
87. Mandel P., Metais P. Les accedes nucleiques du plasma sanguine che l’homme C R Acad Sci Paris. 1948; 142: 241–243.
88. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977; 37: 646–650.
89. Sozzi G., Conte D., Mariani L. i wsp. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow up of lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61: 4675–4678.
90. Wu T.L., Zhang D., Chia J.H., Tsao K.H., Sun C.F. i wsp. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin. Chim. Acta.* 2002; 321: 77–87.
91. Boddy J.L., Gal S., Malone P.R., Harris A.L., Wainscoat J.S. Prospective study of quantification of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 1394–1399.
92. Cassiano C.A., Mediavilla-Varela M., Tan E.M. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Moll Cell Proteomics.* 2006; 5: 1745–1759.
93. Bradley S.V., Oravec-Wilson K.I. i wsp. Serum antibodies to huntingtin interacting protein-1: a new blood test for prostate cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 26–33.
94. Vickers A.J., Savage C., O’Brien M.F., Lilja H. Systematic review of pretreatment prostate-specific antigen velocity and doubling time as predictors for prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 398–403.
95. Ross, R.K., Pike, M.C., Coetzee, G.A. i wsp. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res.* 1998; 58: 4497–4504.
96. Xue W., Irvine R.A., Yu M.C., Ross R.K., Coetze G. A., Ingles S.A. Susceptibility to prostate cancer: interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. *Cancer Res.* 2000; 60: 839–841.
97. Meyer A. Dörk T., Bremer M., Baumann R., Karstens J.H., Machtens S. ATM missense variant P1054R predisposes to prostate cancer. *Radiother. Oncol.* 2007; 83: 283–288.
98. Chen M., Huang Y.C., Yang S. i wsp. Common variants at 8q24 are associated with prostate cancer risk in Taiwanese men. *Prostate* 2010; 70: 502–507.