TH9900035

TH9900035

Diagnosis and Follow Up of Prostate Carcinoma by an in House Prostate Specific Antigen ELISA Kit at Pramongkutklao Hospital

Ltc. Sunetra Dumrongpisutikul

Division of Nuclear Medicine, Department of Radiology Pramongkutklao hospital

Col. Satit Raungdilokrut

Division of Urosurgery, Department of Surgery Pramongkutklao Hospital

ABSTRACT

PSA ELISA kit was developed and compared to a commercial PSA ELISA kit (Cobas® Core PSA EIA, Roche Swizerland) with a correlation of 98.9% ($r = 0.989$, $p < 0.05$). The precision of the assay kit evaluated by intermal quality control studies shown that the coefficient of variation of high, medium and low control were 4.4, 3.6 and 4.7% respectively. The sentuvity of detection was 0.25 ng/ml.

This PSA ELISA kit has been used for detection of PSA in serum of 571 patients ages between 25-93 years old with satisfactory results. The normal range of PSA is 0 - 3.46 ng/ml ($\overline{X}$ = 2SD, n = 384). The mean value of PSA in Prostate carcinoma before treatment and after successful treatment are 77.30 ng/ml (n = 53) and 1.64 ng/ml (n = 25) and increase to 53.71 ng/ml (n = 8) in metastasis. In Benign Prostate Hyperplasia (BPH) the range of PSA is 0 - 27.52 ng/ml (n = 74). Phi (ϕ) coefficient analysis shown that the correlation of PSA and Prostate carcinoma is 63.8% with a sensitivity and specificity of 100% and 86.9% respectively.

บทนำ

มะเร็งต่อมลูกหมากเป็นโรคมะเร็งที่พบมากที่สุดในเพศชายโดยประมาณถึงทุก 1 ใน 11 คน[1] จากการค้นพบ Prostate Specific Antigen (PSA) ในปี 1979[2] ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 34.000 พบได้เฉพาะใน Prostate tissue[3] ทำให้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ต่อมาจนเป็นที่ยอมรับว่าระดับของ PSA เป็น tumor marker ที่สำคัญของมะเร็งต่อมลูกหมาก[4,13] การผลิตชุดน้ำยาตรวจ PSA ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยจึงมีความสำคัญต่อการช่วยวินิจฉัย และติดตามผลการรักษา ผู้ป่วยที่มารับการรักษา จากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ทำให้การศึกษาวิจัยเกี่ยวมะเร็งต่อมลูกหมากสามารถทำได้อย่างกว้างขวางในราคาประหยัด

วัสดุและวิธีการ

การสกัด PSA จากต่อมลูกหมาก

ต่อมลูกหมากได้จากห้องผ่าตัด กองศัลยกรรมในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าโดยเก็บแช่แข็งทันทีหลังผ่าตัดไว้ที่ -70°C รวมไว้จนได้ปริมาณพอควรจึงทำการสกัด PSA โดยวิธีของ Wang[2] โดยได้ดัดแปลงเล็กน้อยเพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องที่มีอยู่ ตามวิธีการย่อที่สรุปไว้ในรูปที่ 1

COMMERCIAL PSA-ELISA KIT

เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Roche Diagnostic Systems, Switzerland

ตัวอย่างที่ตรวจ

น้ำเหลืองจากผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก 113 ราย Benign Prostate Hyperplasia (BOH) 74 ราย, ชายไทยปกติ 384 ราย

การเตรียมชุดน้ำยา PSA

PSA ELISA KIT ที่เตรียมขึ้นประกอบด้วย

1. Microplate Maxisorp F-16 (Nune) จำนวน 96 Wells ซึ่ง coat ผนังด้านในของหลุมด้วย Rabbit anti-PSA dilution 1 : 1000 ใน 0.05 M Carbonate buffer pH 9.6
2. Monoclonal anti-PSA/HRP (Horse Radish Peroxidase) ใน diluent buffer 20 ml.
3. Standard PSA ความเข้มข้น 0, 5, 30และ 120ng/ml.

4. Diluent buffer ใช้ 0.01 M phosphate buffer saline pH 7.4 ซึ่งมี 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA) และ 0.11% Sodium azide จำนวน 50 ml.
5. Washing buffer ประกอบด้วย Normal saline + Tween-20 0.05% จำนวน 250 ml.
6. Substrate solution ประกอบด้วย O-phenylene diamine (OPD) 2 mg 2 เม็ด 0.1 m citrate 0.2 M disodium phosphate buffer PH 5.0 20 ml และ urea hydrogen peroxide (1.75 mg H_2O_2) 1 เม็ด
7. 2.5 N Sulfuric acid 5 ml

วิธีตรวจ PSA

1. เติม standard หรือน้ำเหลืองที่ต้องการตรวจ 200 ul ลงในหลุมใน microplate จำนวน 2 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง นำไปเก็บไว้ในภาชนะชื้นมีฝาปิดเป็นเวลา 60 นาที
2. ล้างด้วย Washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติม monoclonal anti-PSAHRP ลง 200 ul นำไปเก็บไว้ในภาชนะชื้นมีฝาปิด เป็นเวลา 90 นาที
3. ล้างด้วย Washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติม Substrate solution ที่ผสมใหม่ๆลงไป 200 ul นำไปเก็บไว้ในภาชนะชื้นมีฝาปิดเป็นเวลา 30 นาที
4. หยุดปฏิกิริยาของ enzyme-substrate ด้วย 2.5 N H_2SO_4 50 ul
5. นำไปอ่าน Optical density ของสีที่เกิดขึ้นที่ 492 mm ด้วย Titertek Multiskan MCC 340
6. นำค่าที่อ่านได้จาก standard มา plot standard curve ในกระดาษ log-log 2x3 cycles แล้วอ่านค่า PSA จากกราฟนี้

การเปรียบเทียบ In-house PSA-ELISA kit กับ Commercial kit

ได้ทำการเปรียบเทียบผลการตรวจ PSA ในน้ำเหลืองโดยใช้ In-house PSA-ELISA kit และ Roche Diagnostic System kit ในผู้ป่วย จำนวน 34 ราย แล้วนำค่าที่ตรวจได้จากทั้ง 2 kit มาคำนวณหาค่าสหสัมพันธ์ทางสถิติ (Regression analysis)

ผลจากการศึกษาวิจัย

การสกัด PSA จากต่อมลูกหมากพบว่า สามารถสกัด PSA ออกมาใน fraction ที่ 66 - 84 และได้รวม PSA fraction ที่ 70 - 80 ซึ่งมี PSA ในปริมาณสูงดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 นำ PSA นี้ไปทำให้แห้งโดยวิธี Lyophilization ได้ PSA สำหรับใช้เตรียม standard ประมาณ 1.5 mg. นำ PSA นี้ มาเตรียม standard ให้มีความเข้มข้น 0, 5, 30 และ 120 ng/ml จากการเปรียบเทียบ In-house PSA ELISA kit กับ Cobas® Core PSA EIA (Roche) ในการตรวจวิเคราะห์ PSA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์

(r) = 0.989 รูปที่ 3 เกณฑ์ต่ำที่สุด PSA ELISA kit นี้ ตรวจวัดได้ คือ 0.25 ng/ml ($\overline{X}$ + 3 SD ของ Zero standard) การตรวจความแม่นยำ (Precision) ของน้ำยาตรวจนี้ ด้วยการทำ internal quality control พบว่า มีความแม่นยำดีมาก รูปที่ 4 มี coefficient of variation ของ high medium และ low control เท่ากับ 4.4%, 3.6% และ 4.7% ตามลำดับ

จากการใช้ PMK-PSA ELISA kit นี้ในการตรวจ PSA ของผู้ป่วยที่มารับการตรวจและรักษา หรือเฝ้าระวังติดตามการกระจายของโรค ในผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 571 ราย พบว่า ค่าเฉลี่ยของ PSA ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากก่อนการรักษา (n = 53) ระหว่างรักษา (n = 19) และหลังการรักษา (n = 25) เท่ากับ 77.30 $\pm$ 46.28, 22.33 $\pm$ 19.86 และ 1.64 $\pm$ 1.31 ng/ml ตามลำดับ ผู้ป่วยที่มีการกระจายของมะเร็งต่อมลูกหมาก (n = 8) ค่าเฉลี่ยของ PSA เท่ากับ 53.71 $\pm$ 38.0 ng/ml ผู้ป่วยที่ต่อมลูกหมากโต (n = 74) ค่าเฉลี่ยของ PSA เท่ากับ9.42 $\pm$ 9.05 ng/ml ในขณะที่คนปกติ (n = 384) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.38 $\pm$ 1.04 ng/ml รูปที่ 5 เมื่อแบ่งผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากเป็นแบบ localized (n = 7) และ metastasis (n = 8) ก่อนการรักษา พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ PSA เท่ากับ 19.93 $\pm$ 11.25 และ 109.30 $\pm$ 37.10 รูปที่ 6

ความสัมพันธ์ของ PSA กับโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่ามีความสัมพันธ์กัน 63.8% โดยมีความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 100% และ 86.9% ตามลำดับ รูปที่ 7

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาวิจัยนี้ พบว่าชุดน้ำยาตรวจ PSA ที่ผลิตในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้านี้มีประสิทธิภาพดี มีความแม่นยำสูง เทียบเท่ากับชุดน้ำยาที่ซื้อจากต่างประเทศ ทำให้สามารถให้บริการตรวจ PSA ได้ในราคาถูก ทำให้การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็งของต่อมลูกหมากเป็นไปได้อย่างกว้างขวาง จากการใช้ชุดน้ำยาตรวจนี้ ในชายไทยอายุระหว่าง 25-93 ปี จำนวนทั้งสิ้น 384 คน มีความปกติของ PSA อยู่ในช่วง 0 - 3.46 ng/ml ($\overline{X}$ = 2 SD) ในผู้ป่วยที่มีอาการต่อมลูกหมากโต (BPH) ระดับของ PSA จะอยู่ในช่วงปกติ หรือมากกว่าปกติถึง 10 เท่า เพราะฉะนั้นจึงไม่สามารถใช้ PSA เพียงอย่างเดียวในการวินิจฉัยโรคมะเร็งต่อมลูกหมากได้ นอกจากนี้ในผู้ป่วย Prostatitis ก็อาจพบว่ามี PSA สูงกว่าปกติได้ อย่างไรก็ดีในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมากที่ยังไม่ได้รับการรักษา ระดับของ PSA จะสูงกว่าปกติมากดังที่ได้ แสดงไว้ในรูปที่ 5 เมื่อได้รับการผ่าตัดแล้วระดับของ PSA จะลดลงจนเท่ากับคนปกติภายในเวลา 3 - 4 สัปดาห์ เมื่อจำแนกผู้ป่วยตาม ลักษณะของโรคแบบ localized และ metastasis พบว่าระดับของ PSA จะสูงขึ้นตามอาการที่เป็นมากขึ้น นอกจากนี้ยังขึ้นกับปริมาตรของต่อมลูกหมากที่เป็นมะเร็งด้วย

PSA เป็น turmor marker ที่ดีมากในการเฝ้าระวังการกระจายของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก กล่าวคือ ถ้าการผ่าตัดต่อมลูกหมาก ยังมีบางส่วนที่เหลืออยู่หรือมีการกระจายระดับของ PSA จะไม่ลงสู่ระดับปกติภายใน 3 - 4 สัปดาห์ ซึ่งแพทย์จะต้องวินิจฉัยให้การรักษาเพิ่มเติมเป็นรายๆ ไป

ในการติดตามผู้ป่วย หลังการรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมากที่โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า จำนวน 12 ราย พบว่าเมื่อมีการกระจายของโรคมะเร็งต่อลูกหมากไปที่ตับและกระดูก ระดับของ PSA จะสูงขึ้นมาก และระยะเวลาที่ใช้ในการกระจายของโรคจะแตกต่างกันไปในผู้ป่วยแต่ละราย ฉะนั้น PSA จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการการติดตามผลการรักษา และเฝ้าระวังการกระจายของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก เพราะมีความไว 100% ในการตรวจจับการกระจายของโรค ในทางการปฏิบัติพบว่า ผู้ป่วยภายหลังการผ่าตัดควรส่งตรวจ PSA หลังจากนั้น 3 - 4 สัปดาห์ และทุก 3 เดือน ในปีแรกหลังการรักษา ทุก 4 เดือน ในปีที่สอง และทุก 6 เดือน หลังจากนั้น

กิตติกรรมประกาศ

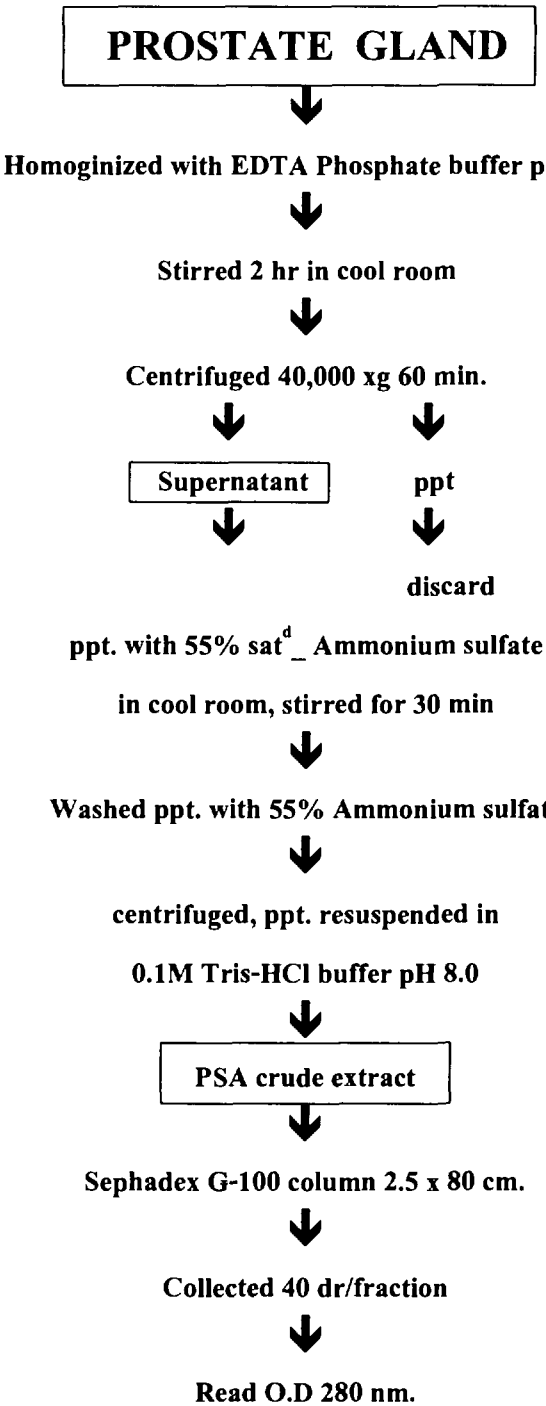
ขอขอบคุณบริษัท Schering-Plough ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้บางส่วน

เอกสารอ้างอิง

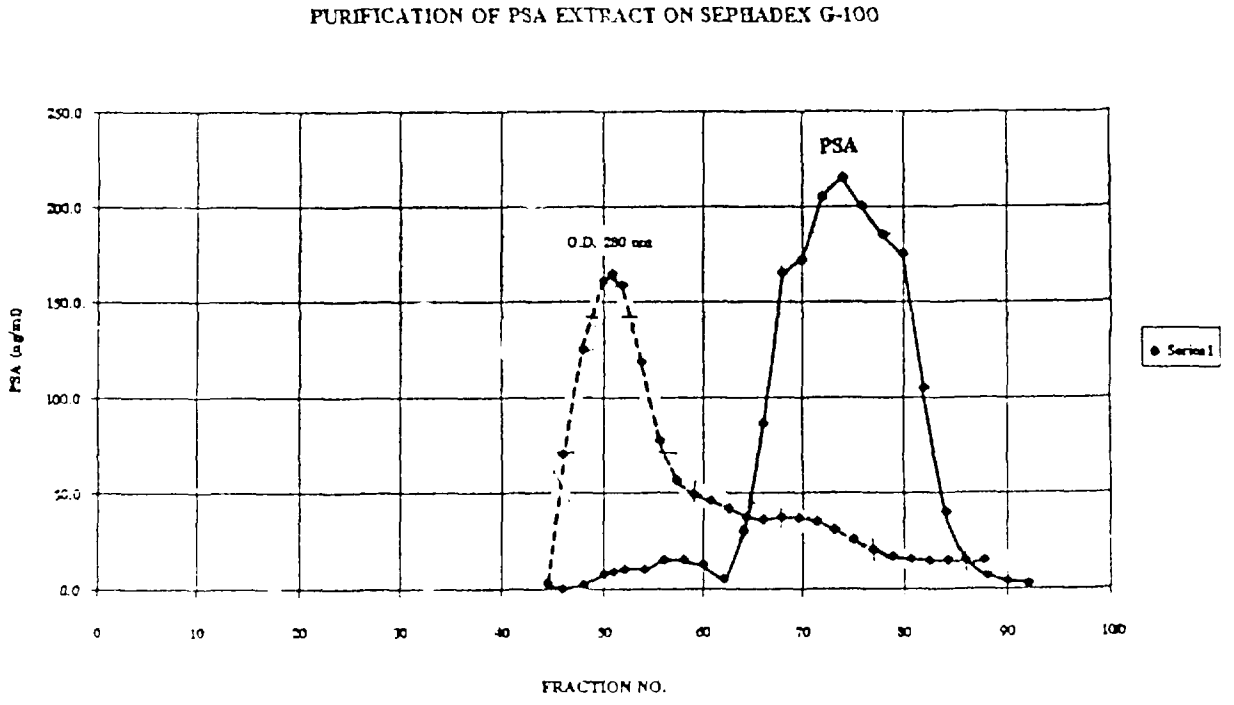
1. Cancer Facts and Fogures-1992. Atlanta, Ga : American Cancer Society Inc ; 1992 ; 10.
2. Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., and Chu, T.M. ; Purification of a human prostate specfic antigen. Invest, Urol., 17:159, 1979.
3. Wang, M.C. Valenguela, L. Murphy. G.P., and Chu, T.M. Tissue specific and human specific antigens in human prostate. Fed. Proc., 36:1254, 1977.
4. I,D., Inaji, H., Loor, R.M., \lin. M.F. Nishiura, T. Slack, N. H. murphy, G.P. and Chu, T.M.: Multiple marker eva;uation in human prostate cancer with the use of tissue-specific antigens. J. Nartl. Cancer Inst., 68:99, 1992.
5. Pontes, J.E., Chu, T.M. Slack, M., J. and Murphy, G.P., : Serum prostatic antigen measurement in localized prostate cancer : correlation with clinical couse. J. Urol., 128 : 1216, 1982.
6. Killian, C.S., Yang, N., Emrich, L. J., Vargas, F.P., Kuriyama, M., Wang, M.C., Slack, N.H., Papsibero, L.D., Murphy, G.P., Chu, T.M. and the Investigators of the National Prostate Cancer Project : Prognostic importance of prostate-specific antigen for monitoring patients with stages B_2 to D_1 prostate cancer. Cancer Res., 45:886, 1985.

7. Killian, C.S., Emrich, L.J., Vargas, F.P., Yang, N., Wang, M.C., Priore, R.L., Murphy, G.P. and Chu, T.M. : Relative reliability of five serially measured markers for prognosis of progression in prostate cancer. J. Natl. Cancer Inst., 76 : 179, 1986.
8. Siddall, : K., Shetty, S.D. and Cooper, E.H. : Measurements of serum gamma-seminoprotein and prostate specific antigen evaluated for monitoring carcinoma of the prostate. Clin. Chem., 32:2040, 1986.
9. Ahmann, F.R. and Schifman, R.B. : Prospective comparison between serum monoclonal prostate specific antigen and acid phosphatase measurements in metastatic prostatic cancer. J. Urol., 137:431, 1987.
10. Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S. and Redwine, E. : Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. New Engl. J. Med., 317:909, 1987
11. Ercole, C.J., Lange, P.H., Mathisen, M., Chiou, R.K., Reddy, P.K. and Vessella, R.L. : Prostatic specfic antigen and prostatic acid phosphatase in the monitoring and staging of patients with prostatic cancer. J. Urol., 138:1181, 1987.
12. Lange, P.H., Reddy, P.K., Medini, E., Levitt, S. and Fraley, E.E. : Radiation therapy as adjuvant treatment after radical pros tatectomy. J. Natl. Cancer Inst., in press.
13. Oesterling, J.E., Chan, D.W., Epstein, J.I., Kimball, A.W., Jr., Bruzek, D.J., Rock, R.C., Brendler, C.B. and Walsh, P.C. : Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. J. Urol., 139:766, 1988

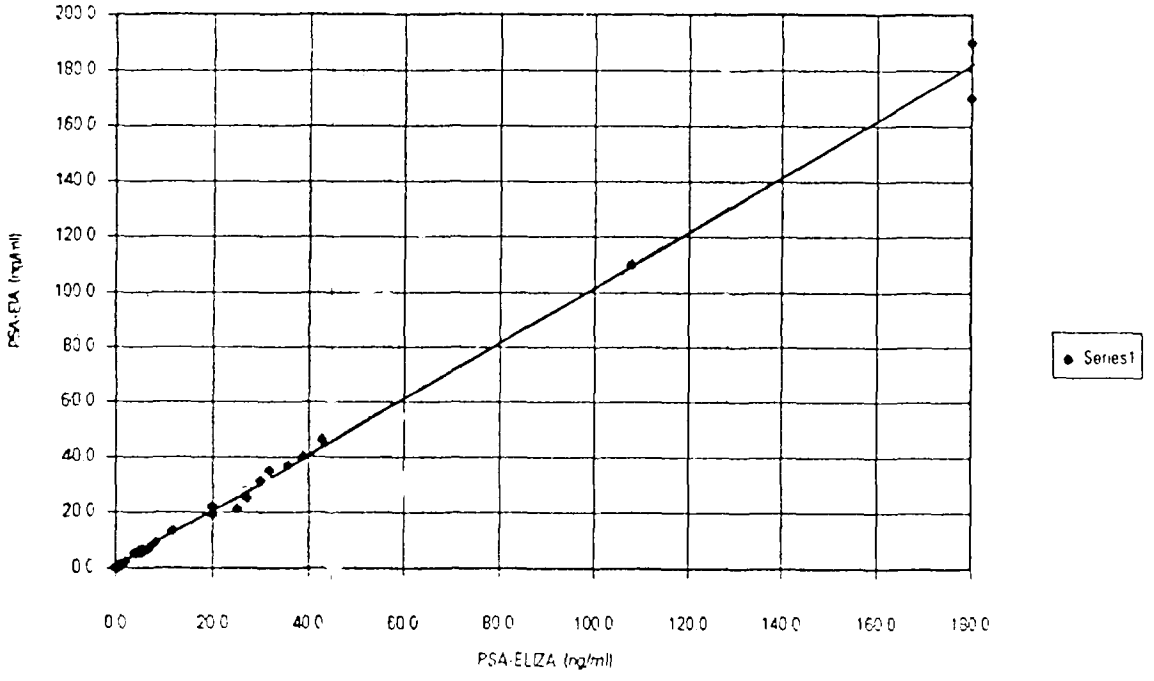
รูปที่ 1 แผนผังวิธีการสกัด PROTATE SPECIFIC ANTIGEN (PSA) จากต่อมลูกหมาก



รูปที่ 2 การสกัด PSA ให้บริสุทธิ์โดยวิธีแยกลำดับส่วนผสม Sephadex G-100



รูปที่ 3 สหสัมพันธ์ของ PMK-PSA ELISA kit และ Commercial kit



รูปที่ 4 Precision of PMK-PSA ELISA kit

Quality Control	Mean ± SD	% coefficient Variation
High Control	42.5 ± 1.87	4.4
Medium Control	10.3 ± 0.37	3.6
Low Control	2.2 ± 1.10	4.7

รูปที่ 5 ระดับของ PSA ในโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก, ต่อมลูกหมากโต และคนปกติ

Patients	PSA ng/ml		
	n	$\overline{X}$	S.D.
Prostate carcinoma before treatment	53	77.30	± 46.28
Prostate carcinoma during treatment	19	22.33	± 19.86
Prostate carcinoma after treatment	25	1.64	± 1.31
Prostate carcinoma metastasis	8	53.71	± 38.05
Prostate hyperplasis	74	9.42	± 9.05
Normal control	384	1.38	± 1.04

รูปที่ 6 ระดับของ PSA ในโรคมะเร็งต่อมลูกหมากก่อนการรักษา จำแนกตามลักษณะของโรค

Prostate carcinoma	PSA ng/ml		
	n	$\overline{X}$	S.D.
Localized	7	19.93	± 11.25
Metastatic	8	109.30	± 37.1

รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ของ PSA และโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก
จากการคำนวณทางสถิติค่าของสัมประสิทธิ์ Phi (ϕ)

PSA-ELISA / Patients	PSA + ve	PSA - ve	Total
Prostate carcinoma	53	0	53
Normal subjects	60	398	458
Total	113	398	511

(ϕ) = 0.6364

ความไว (Sensitivity) = 100%

ความจำเพาะ (Specificity) = 86.9%