

VYUŽITÍ NOVÝCH LABORATORNÍCH UKAZATELŮ V DIAGNOSTICE KARCINOMU MOČOVÉHO MĚCHÝŘE – PILOTNÍ STUDIE

R. Fiala,¹ D. Stejskal²

¹Urologická klinika FN Olomouc

²Oddělení laboratorní medicíny, Nemocnice Šternberk p. o.

Souhrn

Cíle: Endostatin a midkin jsou proteiny, které přímo ovlivňují angiogenezu a podílejí se pravděpodobně na diferenciaci tumoru. E-FABP je epiteliální protein, který se pravděpodobně uvolňuje při vzniku maligních lézí. Cílem práce bylo hodnocení možnosti stanovení koncentrací endostatinu, midkinu a E-FABP v séru i v moči jako nádorového markeru u jedinců s karcinomem močového měchýře.

Soubor a metody: Do studie bylo zařazeno 96 osob, z toho 64 jedinců s endoskopicky a histologicky potvrzeným karcinomem močového měchýře a 32 osob s benigním onemocněním urotraktu. U všech byla provedena cystoskopie (histologie) a vyšetření venózní krve a moče na endostatin, midkin a E-FABP.

Výsledky: Pacienti s prokázaným uroteliálním karcinomem močového měchýře měli hodnoty endostatinu, midkinu a E-FABP v moči významně vyšší ($p < 0,01$) než kontrolní skupina. Hodnoty endostatinu, midkinu a E-FABP v séru byly taktéž u osob s karcinomem měchýře vyšší, avšak pouze stanovení endostatinu dosahovalo uspokojivé diagnostické efektivity (senzitivita 47 %, specifická 83 %, AUC = 0,75, cut-off hodnota 201 µg/l).

Závěr: pacienti s karcinomy močového měchýře mají vyšší hodnoty endostatinu, midkinu, E-FABP a endostatinu v séru i v moči, avšak pouze stanovení endostatinu v séru má dostatečnou diagnostickou efektivitu pro odhad přítomnosti této diagnózy.

Klíčová slova: karcinom močového měchýře, nádorové markery, endostatin, midkin, EFABP.

NEW LABORATORY MARKERS IN BLADDER CANCER WORK UP

Summary

Purpose: Endostatin and midkine are proteins which directly affect angiogenesis and are likely to be involved in tumour differentiation. E-FABP is an epithelial protein likely to be released when malignant lesions arise. The aim was to assess the options for determining both serum and urine concentrations of endostatin, midkine, and E-FABP as tumour markers in individuals with bladder cancer.

Material and methods: The study enrolled 96 people, including 64 people with endoscopically and histologically confirmed bladder cancer and 32 people with benign urinary tract disease. All underwent cystoscopy (histology) and venous blood and urine test for endostatin, midkine, and E-FABP.

Results: The patients with confirmed urothelial carcinoma of the bladder had significantly higher urinary levels of endostatin, midkine, and E-FABP than the control group ($p < 0.01$). Endostatin, midkine, and E-FABP serum levels were also higher in subjects with bladder cancer, endostatin detection, however, was the only to reach satisfactory diagnostic effectiveness (sensitivity 47 %, specificity 83 %, AUC = 0.75; cut-off value 201 µg/l).

Conclusion: Patients with bladder cancer have higher serum and urine concentrations of endostatin, midkine, and E-FABP, detection of serum endostatin, however, is the only to have a diagnostic effectiveness sufficient enough to estimate the presence of this diagnosis.

Key words: bladder cancer, tumour markers, endostatin, midkine, E-FABP.

Česká urologie 2006; 1: 15–18

Úvod

Uroteliální karcinom močového měchýře je onemocnění s variabilním klinickým průběhem a s tendencí k časnému relapsu u téměř 60 % pacientů (1).

Cystoskopie a cytologie moči jsou standardními postupy při diagnostice a dispenzarizaci nádorů močového měchýře. Cytologie je přitom vyšetření, které závisí na bezchybném zpracování vzorku a je zatíženo subjektivní interpretací cytologem. Výsledky jsou dostupné nejdříve za 24 hodin a mají poměrně vysokou senzitivitu přes 80 %, ale

nízkou specifickou (40–60 %) (2). Cystoskopické vyšetření je pro pacienta nepříjemné a zatěžující, a proto se hledají jiné možnosti jak s uspokojivou diagnostickou efektivitou detekovat přítomnost nádorů močového měchýře.

Velký počet studií se zaměřuje na identifikaci laboratorních nádorových markerů, které by mohly doplnit či nahradit současné diagnostické postupy nebo poskytnout informaci k selekci k adjuvantní terapii (3, 4).

Do současnosti byly publikovány zkušenosti s vyšetřením několika laboratorních ukazatelů, do kterých byly

vkládány poměrně velké naděje (TPS, BTA, telomeráza, NMP22, M344, hodnocení aneuploidie chromozómů 3, 7, a 17 a ztrátu lokusu 9p21 metodou fluorescenční in situ hybridizace, Immunocyt test, survivin, livin, atp.). První závěry těchto studií sice hovořily o snížení frekvence cystoskopií při uspokojivé diagnostické efektivitě těchto ukazatelů, další studie však tyto závěry nepotvrdily. Nepodařilo se prokázat, že by tyto ukazatele mohly nahradit cystoskopické vyšetření. Mohou jej pouze ve vybraných případech doplnit (a to ještě ne všechny) (5, 6, 7, 8, 9, 10, 21).

V poslední době se hovoří v kontextu se vznikem maligních nádorů o angiogenezi. V tomto kontextu se jako velice perspektivní při prvních pilotních studiích jeví stanovení endostatinu (11, 12) a midkinu (13,14), což jsou proteiny, které s tímto procesem přímo souvisejí. V souvislosti se vznikem karcinomu močového měchýře lze také spekulovat o možnosti využití stanovení epitelálních proteinů, které se uvolňují při lézích močového měchýře, např. E-FABP-5 (Epidermal Fatty Acid Binding Protein), což je epitelální protein, jehož primární funkcí je vazba mastných kyselin. Pravděpodobně se uvolňuje do moče ze sliznice močového měchýře při maligních lézích a je zvýšeně exprimován při maligních chorobách obecně (15).

Jelikož byla v posledních měsících vyvinuta diagnostická souprava na stanovení koncentrace endostatinu, midkinu a E-FABP, na jejichž validacích jsme se v rámci spolupráce s výrobcem podíleli, stalo se cílem naší práce ověření diagnostické efektivity stanovení těchto proteinů v séru i v moči u pacientů s uroteliálními karcinomy močového měchýře. Dalším cílem bylo zjištění, zda u pacientů s nádorem močového měchýře v anamnéze a negativním endoskopickým nálezem lze z vyšších hodnot endostatinu, midkinu nebo E-FABP predikovat budoucí endoskopicky viditelnou recidivu.

Materiál a metody

Do studie bylo celkem zařazeno 100 pacientů Urologické kliniky ve FN Olomouc. Hodnotitelných bylo 96, z toho 57 mužů a 39 žen. Průměrný věk byl 65,1 roku (19–94 let).

Soubor pacientů:

Do tří skupin bylo rozděleno 96 pacientů. Do první skupiny (A) bylo zařazeno 41 pacientů, kteří měli endoskopicky prokázaný a posléze histologicky potvrzený tumor močového měchýře (tabulka 1). Ani jeden z nich neměl v anamnéze radioterapii ani lokální či systémovou chemoterapii.

Do druhé skupiny (B) bylo zařazeno 23 nemocných, kteří měli v anamnéze histologicky prokázaný uroteliální karcinom a v době odběru moče měli negativní cystoskopii i cytologii.

Do třetí skupiny (C) bylo zařazeno 32 nemocných s jiným urologickým benigním onemocněním vyžadujícím cystoskopii, kteří neměli tumor měchýře ani v anamnéze.

Odběr vzorků

Moč pacientů byla odebírána po očištění vulvy nebo zevního ústí uretry na glandu před plánovanou cystoskopií. Ze středního proudu moče se naplnila zkumavka moče. Její obsah byl rozdělen na 3 části. První byla vyšetřena chemicky a mikroskopicky. Pokud byl výsledek negativní, byla druhá část vyšetřena cytologicky a třetí po separaci v chlazené centrifuze a zamražení transportována na Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk p. o., kde byla uložena při -80 °C pro následné stanovení koncentrace endostatinu, midkinu a E-FABP.

Po odběru moče byl proveden odběr srážlivé krve z kubitální vény a vzorek byl rovněž transportován po identickém zpracování (získání séra, zamražení) do Nemocnice Šternberk, kde byl uložen stejně, jako vzorky moče. Po odběrech byla provedena cystoskopie.

Stanovení endostatinu

Vyšetření bylo provedeno metodou ELISA v sandwichovém uspořádání, soupravou firmy Biovendor laboratorní medicína a. s. (Brno, Česká republika) po předchozí základní validaci soupravy (CV v sérii, $n = 12$ 2,7%; CV mezi sériemi, $n = 12$ 7,6%).

Stanovení midkinu

Vyšetření bylo provedeno metodou ELISA v sandwichovém uspořádání, soupravou firmy Biovendor la-

Tabulka 1. Charakteristika pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře

Podle T	n	%
CIS	1	2,4
Ta	7	17,1
T1	9	22,0
T2	8	19,5
T3	5	12,2
T4	11	26,8
Celkem	41	100,0
Podle G	n	%
G1	11	26,8
G2	12	29,3
G3	18	43,9
Celkem	41	100,0

boratorní medicína a.s. (Brno, Česká republika) po předchozí validaci soupravy (CV v sérii, $n = 12$ 4,1 %; CV mezi sériemi, $n = 12$ 5 %).

Stanovení E-FABP

Vyšetření bylo provedeno metodou ELISA v sandwichovém uspořádání soupravou firmy Biovendor laboratorní medicína a.s. (Brno, Česká republika) po předchozí základní validaci soupravy (CV v sérii, $n = 12$ 9,1 %; CV mezi sériemi, $n = 9$,4 %).

Jako měřicí systém pro všechny tři markery byla použita linka Marc002+Max (Dynatech), která byla dodavatelem řádně validována.

U pacientů ze skupiny B se zvýšenými koncentracemi markerů v krvi, v moči nebo v obou bylo 18 měsíců prováděno cystoskopické vyšetření v rámci dispenzarizace, které mělo za cíl zachytit recidivu nádoru.

Statistické zpracování

Ke statistickému zpracování byl použit software Medcalc (Belgie). Vzhledem k nenormálnímu rozložení dat byl pro srovnání skupin použit test Mann-Whitney a výsledky vyjádřeny jako mediány. Pro odhad diagnostické efektivity byla použita ROC analýza.

Výsledky

Endostatin

Všichni pacienti měli v moči měřitelné hodnoty. Osoby s histologicky prokázaným uroteliálním karcinomem močového měchýře měly hodnoty významně vyšší ($p < 0,01$). Diagnostická efektivita však nebyla dostatečná (mediány pro skupinu A, B, resp. C činily 152; 131 a 136 $\mu\text{g/l}$; AUC $< 0,7$) (tabulka 2).

V séru měli rovněž všichni pacienti měřitelné hodnoty a osoby s histologicky prokázaným karcinomem měchýře měly hodnoty významně vyšší ($p < 0,01$). Diagnostická efektivita byla v tomto případě uspokojivá (mediány pro skupinu A, B, resp. C činily 204; 177 a 185 $\mu\text{g/l}$; AUC 0,75) (tabulka 2). Senzitivita činila 47 % a specifická 83 % při cut-off hodnotě endostatinu 201 $\mu\text{g/l}$.

Midkin

U všech pacientů byly v moči měřitelné hodnoty. Pacienti s prokázaným nádorem měchýře měli hodnoty významně vyšší ($p < 0,01$) (tabulka 2). Diagnostická efektivita však nebyla dostatečná (mediány pro skupinu A, B, resp. C činily 1,47; 0,9 a 0,75 $\mu\text{g/l}$; AUC $< 0,7$).

V séru byl midkin měřitelný a hodnoty pacientů s karcinomem byly významně vyšší ($p < 0,01$) (tabulka 2), ale diagnostická efektivita nebyla dostatečná (mediány pro skupinu A, B, resp. C činily 0,4; 0,35 a 0,36 $\mu\text{g/l}$; AUC $< 0,7$).

E-FABP

V moči byl E-FABP měřitelný u všech probandů. Pacienti s karcinomem močového měchýře měli hodnoty významně vyšší ($p < 0,01$). Diagnostická efektivita však nebyla dostatečná (mediány pro skupinu A, B, resp. C činily 2,3; 2,9 a 2,1 $\mu\text{g/l}$; AUC $< 0,7$) (tabulka 2).

V séru byl E-FABP opět u všech měřitelný a významně vyšší ($p < 0,01$) u pacientů s karcinomem, ale diagnostická efektivita nebyla dostatečná (mediány pro skupinu A, B, resp. C činily 2; 1,5 a 1,6 $\mu\text{g/l}$; AUC $< 0,7$) (tabulka 2).

U pacientů ze skupiny B se nepodařilo zachytit žádnou recidivu v močovém měchýři během 18měsíčního sledování.

Diskuze

Endostatin je inhibitor angiogenezy (20 kDa), který reguluje proliferaci a migraci endotelií. Jedná se o C-terminální, proteolytický fragment kolagenu XVIII (11, 12). Povrchové receptory pro endostatin jsou uloženy na řadě buněk (16), především však maligních tkání (17, 18). Endostatin bývá zvýšen u pacientů s řadou nádorů a jeho zvýšení se zdá být spojeno s agresivitou tumoru (19). Endostatin se váže z maligních tkání především na buněčné linie karcinomu prostaty a močového měchýře (17, 19). Méně silná vazba byla prokázána na maligní tkáně ledvin (17).

V experimentech bylo zjištěno, že jedinci s karcinomy močového měchýře měli vyšší hodnoty endostatinu a jeho zvýšení odpovídalo stádiu tumoru (11, 12, 16, 17, 18). V naší sestavě byl endostatin měřitelný v moči i v séru. Pacienti s karcinomem měli vyšší hladiny než kontrolní skupina a diagnostická efektivita byla uspokojivá.

Tabulka 2. Mediány měřených ukazatelů v moči i v séru

Parametr	CaVU ANO	CaVU anamn	CaVU NE
Moč-midkine	1,47	0,90	0,75
Sérum-midkine	0,40	0,35	0,36
Moč-endostatin	152,00	131,00	136,00
Sérum-endostatin	204,00	177,00	185,00
Moč-E-FABP	2,30	2,90	2,10
Sérum-E-FABP	2,00	1,50	1,60

Vysvětlivky:

CaVU ANO = histologicky prokázaný karcinom močového měchýře

CaVU anamn = anamnesticky prokázaný karcinom močového měchýře s negativní cystoskopií a histologickým nálezem

CaVU NE = benigní onemocnění urotraktu

Midkin tvoří s cytokinem pleiotrophinem (PTN) PTN/MK vývojovou rodinu (13). Midkin pravděpodobně funguje jako intercelulární cytoprotektivní signál, chránící buňky před účinkem chemoterapie (14). Jde o heparin vázající faktor, který je přítomen v řadě maligních buněk (20). Pilotní studie prokázaly, že MK pravděpodobně přímo ovlivňuje metastazování tumorů a je v přímém vztahu k jejich růstu, jelikož přímo stimuluje angiogenezu (13, 14, 20). Prokázali jsme, že je stanovitelný v moči, ale vzhledem k nízké diagnostické efektivitě se samostatně nejví jako vhodný nádorový ukazatel.

E-FABP (epidermální protein vázající mastné kyseliny) je vazebný protein pro mastné kyseliny, který se vyskytuje extracelulárně na epiteliích a o jeho úloze v tumorigenezi existují zatím pouze ojedinělé informace (15). Přestože se do moče uvolňuje pravděpodobně v závislosti na maligním onemocnění urotraktu a je v moči i stanovitelný, jeho diagnostická efektivita nebyla v našem souboru uspokojivá.

Naše nálezy potvrdily, že hodnoty koncentrací výše diskutovaných tří měřených proteinů v moči i v séru jsou

u pacientů s histologicky prokázanými karcinomy močového měchýře významně vyšší. Stanovení endostatinu v séru přitom vykazovalo dostatečnou diagnostickou efektivitu pro rutinní diagnostiku tohoto onemocnění.

Zda lze pomocí stanovení uvedených ukazatelů odhadovat recidivu onemocnění nelze po 18 měsících uzavřít, protože nebyla ani jedna recidiva dosud zachycena.

Závěr

Z pilotní studie vyplývá, že stanovení endostatinu v séru vykazuje dostatečnou diagnostickou efektivitu pro odhad přítomnosti karcinomu močového měchýře. Pacienti s karcinomy močového měchýře mají taktéž vyšší hodnoty endostatinu, midkinu i E-FABP v moči a midkinu a E-FABP v séru, nicméně hodnoty nejsou z klinického hlediska diagnostické.

MUDr. Richard Fiala

Urologická klinika, FN Olomouc
I. P. Pavlova 6, 77520 Olomouc
e-mail: fialar@fnol.cz

Literatura

- Ozen H, Hall MC. Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 255–259.
- Sharp JD, Hausladen DA, Maher MG, Wheeler MA, Altieri DC, Weiss RM. Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis. *Front Biosci* 2002; 7: 36–41.
- Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 1998; 160: 645–659.
- Davies B, Chen J, Modugno FM, Weissfeld J, Landsittel D, Dhir R, Nelson J, Getzenberg RH. Contribution of the prostate limits the usefulness of survivin for the detection of bladder cancer. *J Urol* 2005; 174: 1767–1770.
- Boman H, Hedelin H, Holmang S. Four bladder tumor markers have a disappointing sensitivity for small size and low grade recurrence. *J Urol* 2002; 167: 80–83.
- Fradet Y, Cordon-Cardo C. Critical appraisal of tumor markers in bladder cancer. *Semin Urol* 1993; 11: 145–153.
- Pode D, Golijanin D, Herman Y. Immunostaining of Lewis X in cells from voided urine. *J Urol* 1998; 159: 389–392.
- Sarosdy MF, de Vere White RV, Soloway MS. Results of multicentric trial using the BTA test to monitor for and diagnose recurrent bladder cancer. *J Urol* 1995; 154: 379–383.
- Soloway MA, Briggman JV, Carpinito GA. Use of a new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurrent transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment. *J Urol* 1996; 156: 363–367.
- Informace o nových ukazatelích na karcinomu močového měchýře na <http://www.ctc-comm.com/Publishing/uro/uross0304bladdercancer.htm>
- Grosios K. Endostatin (EntreMed). *IDrugs* 2000; 7: 799–810.
- Wickstrom SA, Alitalo K, Keski-Oja J. Endostatin signaling and regulation of endothelial cell-matrix interactions. *Adv Cancer Res* 2005; 94: 197–229.
- Mirkin BL, Clark S, Zheng X, Chu F, White BD, Greene M, Rebbas A. Identification of midkine as a mediator for intercellular transfer of drug resistance. *Oncogene* 2005; 24: 4965–4974.
- Salama RH, Muramatsu H, Zou P, Okayama M, Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding growth factor, produced by the host enhances metastasis of Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Lett* 2005.
- Munz M, Zeidler R, Aires O. The tumor-associated antigen EpCAM upregulates the fatty acid binding protein E-FABP. *Canc Lett* 2005; 225: 151–157.
- Sumi M, Satoh H, Kagohashi K, Ishikawa H, Sekizawa K. Increased serum levels of endostatin in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Lab Anal* 2005; 19: 146–149.
- Schmidt A, Sommer F, Reiner M, Klotz T, Engelmann U, Addicks K, Bloch W. Differential endostatin binding to bladder, prostate and kidney tumour vessels. *BJU Int* 2005; 95: 174–179.
- Du Z, Hou, S. The anti-angiogenic activity of human endostatin inhibits bladder cancer growth and its mechanism. *J Urol* 2003; 170: 2000–2003.
- Guan KP, Ye HY, Yan Z, Wang Y, Hou SK. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2003; 61: 719–723.
- Herradon G, Ezquerro L, Nguyen T, Silos-Santiago I, Deuel TF. Midkine regulates pleiotrophin organ-specific gene expression: evidence for transcriptional regulation and functional redundancy within the pleiotrophin/midkine developmental gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 714–721.
- Babjuk M, Kostirova M, Mudra K et al. Qualitative and quantitative detection of urinary human complement factor H-related protein (BTA stat and BTA TRAK) and fragments of cytokeratins 8, 18 (UBC Rapid and UBC IRMA) as markers for transitional cell carcinoma of the bladder. *European Urology* 2002; 41: 34–39.