

J. Klečka¹, R. Pikner², P. Toufarová¹,
L. Holubec², O. Topolčan³, L. Pecení³

¹Urologická klinika, Fakultní nemocnice Plzeň
přednosta: doc. MUDr. Zdeněk Ouda, CSc.

²ONM - úsek imunodiagnostiky, Fakultní
nemocnice
primář: MUDr. Dagmar Slípková

³2. interní klinika, Fakultní nemocnice Plzeň
přednosta: prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

CYTOKERATINY TPA, TPS, CYFRA 21-1 A UBC V SÉRU A MOČI JAKO MOŽNÉ NÁDOROVÉ MARKERY KARCINOMU MOČOVÉHO MĚCHÝŘE

KLÍČOVÁ SLOVA

Cytokeratiny
TPA
TPS
Cyfra 21-1
UBC
Karcinom močového měchýře
Infekce močových cest

KEY WORDS

Cytokeratins
TPA
TPS
Cyfra 21-1
UBC
Urinary Bladder Cancer
Urinary Tract Infection

SOUHRN

Autoři prezentují výsledky pilotní studie věnované klinickému významu detekce cytokeratinů v séru a moči jako jednoho z neinvazivních nástrojů k detekci recidiv nebo primárního nádoru močového měchýře. Výsledky zahrnují 53 pacientů (19 s primárním nádorem močového měchýře či recidivou, 18 pacientů s klinicky a mikrobiologicky ověřenou infekcí močových cest, 16 zdravých probandů). Pacienti s iritací urotelu nádorové i infekční povahy mají vyšší hladiny cytokeratinů v moči než zdraví probandi. Senzitivita TPA a UBC v moči dosahuje 73,7 % při specifitě 87,5 %. V budoucnu bude nutné vypracovat doporučené protokoly odběru vzorků moči a zjistit význam cytokeratinů pro grading tumoru a pro dlouhodobé sledování nádorového onemocnění.

SUMMARY

CYTOKERATINS TPA, TPS, CYFRA 21-1 AND UBC OF SERUM AND URINE LEVEL AS POSSIBLE TUMOUR MARKER FOR URINE BLADDER CARCINOMA

Authors present a pilot study results devoted to the clinical role of serum and urine cytokeratins detection. This method seems to be one of the noninvasive tool of detection of the primary urinary bladder cancer or its recurrency. The study involves 53 patients (19 with cystoscopically verified bladder cancer or its recurrency, 18 patients with clinically and microbiologically confirmed urinary tract infection, 16 healthy volunteers). Patients with urothelium irritated by tumour or infection had significantly higher levels of cytokeratins in urine than healthy volunteers. Sensitivity of urine TPA and UBC was 73.7 % at specificity of 87.5%. It is necessary to establish standardised protocols of urine collection and investigate the importance of cytoke-ratins for tumour grading and follow up in tumour diseases.

ÚVOD

Incidence karcinomu močového měchýře v České republice činila v roce 1991 20,6 případů na 100 000 obyvatel/rok u mužů a 6,5 případů na 100 000 obyvatel/rok u žen. V absolutním počtu to znamená 1030 nově diagnostikovaných onemocnění u mužů a 343 nových případů u žen. Od roku 1977 došlo k nárůstu incidence o 45,1 % u mužů a o 124,1 % u žen [1]. Monitorování a léčba karcinomu močového měchýře vyžaduje četné a dlouho-dobé klinické sledování, neboť míra recidiv u tohoto onemocnění dosahuje až 70 % v průběhu 5 let. V současnosti je cystoskopické vyšetření rozhodujícím vyšetřením jak pro iniciační diagnózu, tak i monitorování karcinomu močového měchýře. Protože cystoskopie je invazivní vyšetření, hledají urologové možné neinvazivní metody diagnostiky a detekce recidiv nádorů močového měchýře. Slibnou cestou se jeví detekce markerů karcinomu močového měchýře v moči a v séru. Jednou z možností je stanovení fragmentů cytokeratinů.

Cytokeratiny patří do skupiny proteinů tvořících intermediální filamenta, které jsou hlavní složkou cytoskeletonu buněk. Existuje 20 různých cytokeratinů s molekulovou hmotností mezi 40 až 70 kilodaltony, které jsou klasifikovány podle izoelektrického bodu do dvou hlavních podskupin: acidické (typ I) a bazické (typ II) [2].

Expres jednotlivých cytokeratinů je závislá na typu tkáně a stupně diferenciaci a rychlosti růstu [3]. Čtyři typy cytokeratinů charakterizují jednoduchý epitel, dva acidické (číslo 18 a 19) a dva bazické (číslo 7 a 8). Pomocí imunohistochemického vyšetření je lze prokázat v cytoplasmě jak nádorových buněk epitelálního původu, tak i normálních epitelálních buněk. Přestože jsou cytokeratiny za fyziologických podmínek nerozpustné v séru a tkáňových tekutinách, v tělesných tekutinách prokazujeme jejich ve vodném prostředí solubilní fragmenty vzniklé proteolýzou [4]. Koncentrace cytokeratinů v moči je pravděpodobně dána součtem frakce, která je do moči filtrována ze séra ledvinami, a frakce cytokeratinů uvolňovaných přímo z uroteliálních buněk.

Signifikatně zvýšené hodnoty cytokeratinových fragmentů v moči lze najít kromě nádorů vycházejících z urotelu i u zánětů močových cest.

Vzhledem k tomu, že dostupné metodiky na stanovení cytokeratinů detekují pokaždé jiný typ či jiné spektrum fragmentů cytokeratinů (Cyfra 21-1 detekuje cytokeratin 19, TPS detekuje M3 epitop cytokeratinu 18, TPA-M detekuje cytokeratiny 8, 18 a 19, UBC detekuje cytokeratiny 8 a 18 v moči [5]), bylo cílem této práce zhodnotit diagnostické možnosti jednotlivých metod stanovujících cytokeratinové fragmenty v séru a moči u pacientů s karcinomem močového měchýře.

Tab. 1: Histopatologické rozdělení pacientů s nádory močového měchýře

Grading	Staging					Celkem pacientů
	pTa	pT1	pT2	pT3	pT4	
I.	2	5	2	1	1	11
II.	1	2	3	0	0	6
III.	0	0	1	1	0	2
Celkem pacientů	3	7	6	2	1	19

MATERIÁL A METODY

Skupiny pacientů:

Celkem bylo do studie zařazeno 53 pacientů, rozdělených do tří skupin.

Skupinu 1 (C67) tvořilo 19 pacientů s cystoskopicky verifikovaným prvozáchytem nádoru močového měchýře nebo recidivou tumoru (věkové rozmezí 46 - 80 let s průměrným věkem 62,8 let). Skupina jedna byla rozdělena dle rozsahu onemocnění na povrchové nádory (pTa, T1) a nádory s invazí do svaloviny (pT2, pT3, pT4) a dle gradingu (I. až III.) dle TNM klasifikace (viz tab.1).

Skupinu 2 (N30) tvořilo 18 probandů s klinicky a mikrobiologicky ověřenou infekcí dolních močových cest (věkové rozmezí 39 - 85 let s průměrným věkem 60,0 let).

Skupinu 3, kontrolní, (R69) tvořilo 16 zdravých dobrovolníků (věkové rozmezí 17 - 78 let s průměrným věkem 47,4 let).

Odběr a zpracování vzorků:

Vzorky moči byly získány odběrem 10 ml z prvé ranní porce, byly zcentrifugovány při 2000 ot/min po dobu 10 min a supernatant byl až do zpracování uchován při -70 °C. Naměřené hodnoty byly korigovány na množství kreatininu v moči. Současně bylo nalačno odebráno 5 ml srážlivé venózní krve a následnou centrifugací při 2000 ot/min po dobu 10 min bylo odděleno sérum, které bylo až do zpracování uchováno při -70 °C. U všech probandů byly vyšetřeny v séru a v moči následující markery: S-TPA, S-TPS, S-Cyfra 21-1 a U-TPA, U-TPS, U-Cyfra 21-1, UBC (pouze v moči).

Ke stanovení byly užity komerčně dodávané soupravy, které detekují pokaždé jiný typ či jiné spektrum fragmentů cytokeratinů. Cyfra 21-1 (IRMA, CIS Bio International, France), TPS (IRMA, Beki, Sweden), TPA-M (IRMA, BykSangtec, Sweden), UBC (IRMA, IBL Biotech AB, Sweden). Kreatinin v moči by stanoven Jaffeho reakcí.

Statistické zpracování:

Zjištěné hodnoty cytokeratinů v séru a moči byly zhodnoceny dle klinického stavu. Abychom byli schopni zhodnotit výsledky pro jednotlivé nádorové markery a vzájemně je porovnat, drželi jsme se doporučení „Hamburger Group for Standardization of Tumour Markers“ [6] a ustanovili jsme hodnoty „cut off“ (hra-niční meze) pro každou metodu při stejné specifitě a následně vypočítali senzitivitu, pozitivní (PV+) a negativní (PV-) prediktivní hodnotu a relativní riziko (RR) pro jednotlivé nádorové markery. Statistická analýza obsahovala deskriptivní popis jednotlivých podsouborů, korelace mezi jednotlivými proměnnými byly zjišťovány pomocí Spearmanova pořadového korelačního koeficientu. Vzhledem k negausovské distribuci hodnot markerů ve vyšetřovaných skupinách byla provedena analýza rozdílů distribucí Wilcoxonovým testem a byly udány hodnoty mediánu, 25 % a 75 % percentilů (Q1 a Q3). K vyhodnocení byl použit statistický software S.A.S, U.S.A., verze 6.12.

Tab. 2: Senzitivity, PV+, PV-, RR pro jednotlivé nádorové markery v séru

	Cut off	Jednotky	Senzitivita	PV+	PV-	RR	Specificita
S - Cyfra 21-1	1,3	ng/mL	52,6 %	83,3 %	60,9 %	2,13	87,5 %
S - TPA	79	IU/L	10,5 %	50,0 %	45,2 %	0,91	87,5 %
S - TPS	102	IU/L	15,8 %	60,0 %	46,7 %	1,13	87,5 %

Tab. 3: Senzitivity, PV+, PV-, RR pro jednotlivé nádorové markery v moči

	Cut off	Jednotky	Senzitivita	PV+	PV-	RR	Specificita
U - Cyfra 21-1	0,52	ng/mmoL	68,4 %	86,7 %	70,0 %	2,89	87,5 %
U - TPA	33	IU/mmoL	73,7 %	87,5 %	73,7 %	3,33	87,5 %
U - TPS	13,5	IU/mmoL	36,8 %	77,8 %	53,8 %	1,68	87,5 %
UBC	0,118	ng/mmoL	73,7 %	87,5 %	73,7 %	3,33	87,5 %

VÝSLEDKY

Na obr. 1 - 7 jsou znázorněny distribuce hodnot jednotlivých stanovených markerů v séru a v moči.

V séru se signifikantně lišily distribuce hodnot S-Cyfra 21-1 skupiny 1 (C67), proti skupině 3 (R69) ($p < 0,03$) a proti skupině 2 (N30) ($p < 0,04$). U markerů S-TPA a S-TPS jsme neprokázali žádné statisticky významné rozdíly mezi námi sledovanými skupinami.

V moči byly nalezeny statisticky vysoce významné rozdíly v distribucích hodnot u U-Cyfra 21-1 ($p < 0,007$), U-TPA ($p < 0,002$), UBC ($p < 0,008$) mezi skupinami 1 (C67) a 3 (R69) a u U-TPS nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Mezi skupinou 2 (N30) a 3 (R69) byly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly U-Cyfra 21-1 ($p < 0,0001$), U-TPA ($p < 0,016$), UBC ($p < 0,012$), u U-TPS se distribuce hodnot nelišily.

Při srovnání skupin 1 (C67) a 2 (N30) se nenalezly žádné statisticky významné rozdíly v distribuci hodnot cytokerinů v moči.

Při analýze korelací jednotlivých cytokerinů v moči pomocí Spearmanova pořadového korelačního koeficientu (p značí statistickou významnost a r pak korelační koeficient) jsme našli v celém souboru dat:

UBC koreluje s:

U-TPA	$p < 0,0002$	$(r = 0,761)$
U-Cyfra 21-1	$p < 0,0006$	$(r = 0,711)$
U-TPS	$p < 0,001$	$(r = 0,691)$

dále,

U-TPA koreluje s:

U-Cyfra 21-1	$p < 0,0001$	$(r = 0,951)$
U-TPS	$p < 0,001$	$(r = 0,874)$

a

U-TPS koreluje s:

U-Cyfra 21-1	$p < 0,0001$	$(r = 0,86)$
--------------	--------------	--------------

Mezi sérovými a močovými hodnotami cytokerinových markerů nebyla nalezena žádná statisticky významná korelace.

Hodnoty cytokerinů v moči a v séru skupiny 3 (R69) zdravých dobrovolníků byly užity ke stanovení normálních hodnot. Vzhledem k velikosti souboru byla zvolena pro všechny markery specifická (SP) 87,5 %. Při této specifitě byly určeny diskriminační hodnoty (*cut off*) pro jednotlivé markery jak v séru, tak i v moči.

V tabulkách 2 a 3 jsou shrnuty pro jednotlivé markery zjištěné diskriminační hodnoty (*cut off*), senzitivity (SN), pozitivní a negativní prediktivní hodnoty (PV+ a PV-) a relativní risk (RR).

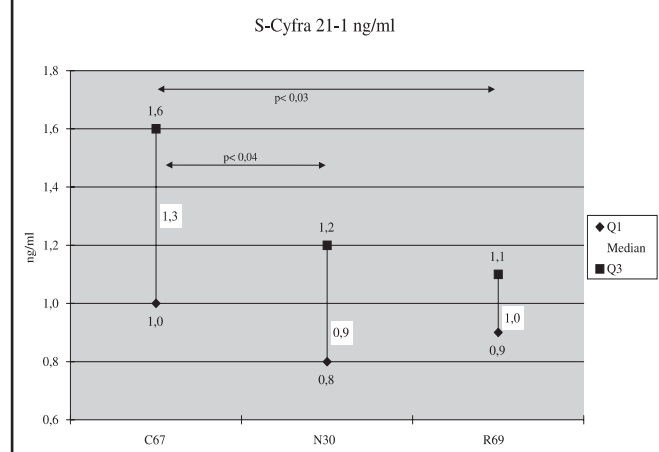
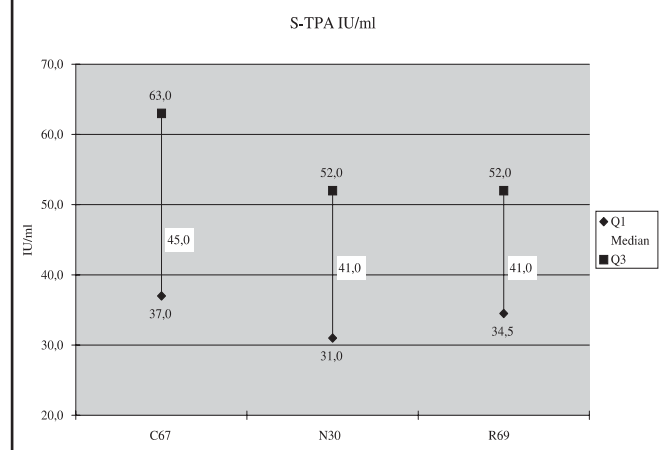
Senzitivity sérových markerů v souboru C 67 dosahují nízkých hodnot a nedostačujících pozitivních i negativních prediktivních hodnot, kromě Cyfra 21-1 (viz tab. 2).

V moči se naproti sérovým hodnotám pohybovaly senzitivity mezi 36,8 - 73,7 %. Největší senzitivitu, pozitivní a negativní prediktivní hodnotu měly v moči stanovení UBC a U-TPA. Naopak nejnižší senzitivitu mělo stanovení TPS v moči (U-TPS) (viz tab. 3).

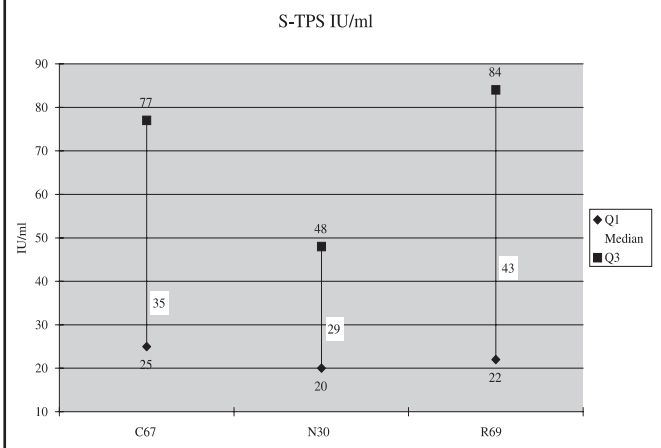
DISKUSE

Autoři se v pilotní práci zabývají problémem stanovení fragmentů cytokerinů v séru a moči z pohledu významu různých dostupných

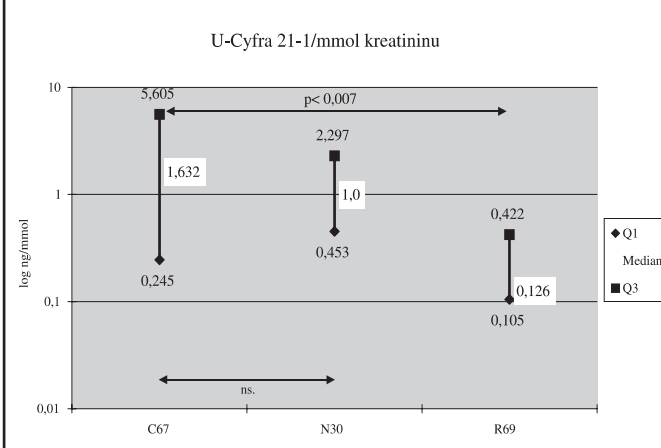
metodik ke stanovení těchto fragmentů. Většina ostatních publikovaných prací hodnotila význam pouze jedné metody na stanovení cytokerinů či se autoři zabývali buď stanovením v séru nebo v moči [7, 8, 9, 10]. Většina prací, kromě několika publikací [10, 11], se nezabývá srovnáním hodnot cytokerinů u pacientů s nádorem močového měchýře a infekcí močových cest. Není ani jednotnost v metodice odběru vzorků moči. Někteří autoři užívají

Obr. 1: Hodnoty Cyfra 21-1 v séru**Obr. 2:** Hodnoty TPA v séru

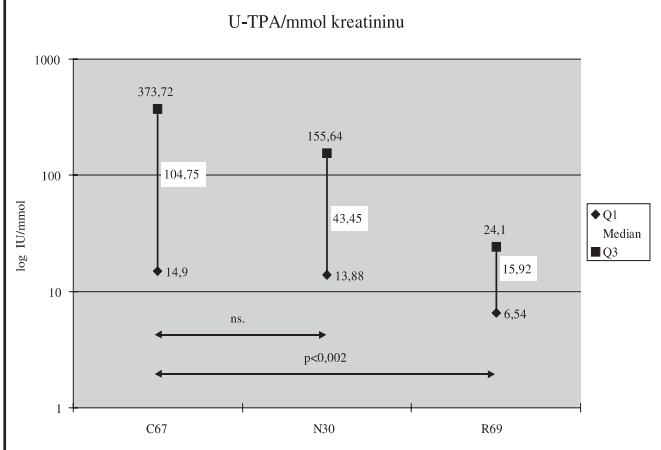
Obr. 3: Hodnoty TPS v séru



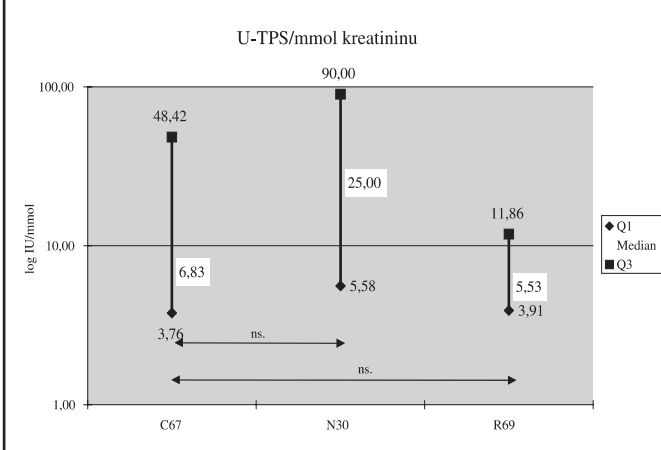
Obr. 4: Hodnoty Cyfra 21-1 v moči



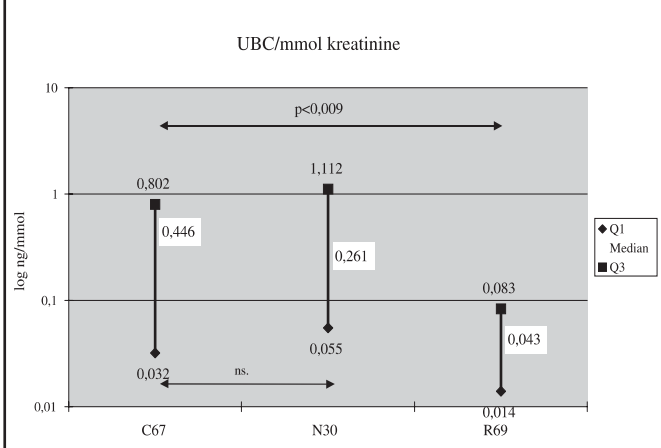
Obr. 5: Hodnoty TPA v moči



Obr. 6: Hodnoty TPS v moči



Obr. 7: Hodnoty UBC v moči



24hodinový sběr [9, 11] a vztahují hodnoty k celkové diuréze, jiní vztahují hodnoty cyto-keratinů na koncentraci kreatininu v moči [10]. V naší studii jsme se snažili minimalizovat preanalytické chyby a rozhodli jsme se proto pro odběr z první porce ranní moči. Hodnoty cyto-keratinů byly vztaženy na koncentraci kreatininu.

U našeho souboru jsme neprokázali význam sérových hodnot cyto-keratinů. Toto zjištění si vysvětlujeme vysokým zastoupením stadií pTa, pT1 a pT2 (viz tab. 1), což se shoduje i s výsledky práce Menedeze V. et al. [12].

Autoři studie prokazují, že močové hodnoty cyto-keratinů daleko citlivěji reagují na onemocnění urotelu, statisticky významně zvýšené hodnoty se nacházejí jak u pacientů s nádorovým onemocněním močového měchýře, tak u skupiny probandů s infekcí močových cest. Na rozdíl od prací jiných autorů [8, 9, 10] se TPS zdá být nejméně vhodným markerem ze všech sledovaných. Pro malý počet pacientů v jednotlivých skupinách se nebylo možno držet doporučení fixně stanovit specificku na 95 % [6], a užili jsme tedy specificku blízkou se 90 %. Vzhledem k vysokým korelačním koeficientům mezi jednotlivými sledovanými metodami a s ohledem na cenu vyšetření lze v budoucnu užít pouze jedné metody stanovení cyto-keratinu. Tato pilotní studie potvrdila reálnou možnost využití stanovení cyto-keratinů v moči, na druhé straně je třeba většího souboru pacientů, abychom plně vyhověli doporučením "Hamburger Group for Standardization of Tumour Markers" [6] a zároveň ověřili možné rozdíly v koncentracích cyto-keratinů podle gradingu. Současně by bylo vhodné provést i srovnání s dalšími markery stanovenými v moči. Jak naznačují některé poslední studie, markery typu NMP22 [13, 14] a BTA [15] jsou slibnými markery se shodným významem, jako jsou cyto-keratiny.

ZÁVĚR

U lokalizovaného nádorového onemocnění se sérové hodnoty nádorových markerů pohybují v rozmezí normálních hodnot.

Stanovení cytokeratininových nádorových markerů v moči umožňuje rozlišení od zdravých pacientů, ale zánětlivá onemocnění močových cest mají nespecificky zvýšené hodnoty sledovaných nádorových markerů v moči.

Vzhledem k dosažené senzitivitě se U-TPA a UBC zdají být vhodnými markery k rozlišení pacientů s primárním nádorem močového měchýře či recidivou od zdravých jedinců, jejichž hodnoty spolu taktéž silně a vysoce signifikantně korelují.

Vzhledem k silným korelacím mezi jednotlivými nádorovými markery lze v budoucnu užít stanovení pouze jednoho nádorového markeru

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. 4780-3 a MŠTM ČR č. J13/98:111400003.

LITERATURA

1. Geryk, E. et al.: Vývoj incidence zhoubných nádorů v České republice 1977 -1991. Brno, Masarykův onkologický ústav 1996, 23 s.
2. Moll, R., Franke, WW., Schiller, DL., Geiger, B., Krepzner, R.: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 1982, 31: s.11-24.
3. Fuchs, E., Tyner, AL., Guidice, G., Marchuk, D., Ray Chaudhury, A., Rosenberg, M.: The human keratin genes and their differential expression. In Sawyer RH, ed. The Molecular and Developmental Biology of Keratins. New York, Academic Press, 1987: s. 5-34.
4. Sündström, B.E., D'Amico, Y., Brundell, J.: Development of a new Profiligen TPA IRMA assay using monoclonal anti-cytokeratin antibodies. The international Journal of Biological Markers 1995, Vol 10 no.3, s. 166 -173.

5. Correale, M., Arnberg, H, Blockx, P., Bombardieri, E., Castelli, M., Encabo, G., Gion, M., Klapdor, R.: Clinical profile of a new monoclonal antibody-based immunoassay for tissue polypeptide antigen. The International Journal of Biological Markers 1994, Vol 9 no.4, s. 231-238.
6. Arbeitsgruppe Qualitätskontrolle und Standardisierung von Tumormarkertest in Rahmen der Hamburger Symposien über Tumormarker (1992). Tumordiagnose und Therapie 1992; 5: XIX-XXII.
7. Adolphs, H.D., Oehr, P.: Significance of plasma tissue polypeptide antigen determination for diagnosis and follow-up of urothelial bladder cancer. Urol. res. 1984, vol.12, s. 125 -128.
8. Halim A.B., el-Ahmady O., Hamza, S., Aboul-Ela, M., Oehr, P.: Serum TPS versus TPA in Egyptian bladder cancer patients. Int. J.Biol.Markers 1993, vol. 8, s. 221 -226.
9. el-Ahmady O., Sanaa Eissa, Gamal El-Din A., van Dalen, A.: TPS in serum and urine of Egyptian bladder cancer patients. Oncology Reports 1994, vol. 1, s. 519 -521.
10. Wei-jen, Y., Chin-jen, Ch. : Significance of urinary tissue polypeptide specific antigen (TPS) determination in patients with urothelial carcinoma. Anticancer Research 1995, vol. 15, s. 2819-2824.
11. Krhut, J., Batoš, V. a kol. : Využití stanovení hladiny tkáňového polypeptidického antigenu (TPA) v séru a v moči k diagnostice a sledování urologických onemocnění. Česká urologie 1999, číslo 1, s. 22 - 26.
12. Menedez, V., Filella, X : Role of tissue polypeptide antigen as a marker in bladder cancer. Actas Urol. Esp. 1995, vol 19, s. 441 - 444.
13. Craig, Z., Lackshmi, P., Agarwal, A.: NMP22 is a sensitive, cost-effective test in patients at risk for bladder cancer. The Journal of Urology 1999, vol. 161, s. 62 - 65
14. Soloway, M., Briggman, J., Carpinito, G., Chodak, G., Church, P., Lamm, D., Lange, P.: Use of a new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment. The Journal of Urology 1996, vol. 156, s. 363 - 367.
15. Stieber, P., Tauber, S., Schmitt, U., Hansholzner, U., Reiter, W., Hofmann, K., Schmeller, N.: BTA trak - a useful diagnostic tool in urinary bladder cancer. Tumor Biology 1997, vol. 18/4, (abstract XXV. ISOBM meeting).

MUDr. Jiří Klečka
Urologická klinika
Fakultní nemocnice
E. Beneše 13
305 99, Plzeň
E-mail: kleckaj@fnplzen.cz