

M. Louda¹, E. Malířová², J. Pacovský¹,
P. Morávek¹, B. Dlabalová²

¹Urologická klinika FN a LF UK
v Hradci Králové

přednosta doc. MUDr. P. Morávek, CSc.

²Oddělení nukleární medicíny FN a LF UK
v Hradci Králové

primář MUDr. et ing. J. Vižďa

DIAGNOSTIKA RECIDIVUJÍCÍHO NÁDORU MOČOVÉHO MĚCHÝŘE POMOCÍ STANOVENÍ HLADIN CYTOKERATINU 8 A 18 V MOČI

KLÍČOVÁ SLOVA

Uroteliální karcinom močového měchýře
Cytokeratin
UBC IRMA[®] test

KEY WORDS

Urothelial urinary bladder cancer
Cytokeratine
UBC IRMA[®] test

SOUHRN

Cíl: Neinvazivní diagnostika maligních onemocnění je přáním všech lékařů. V této práci je publikován soubor nemocných vyšetřených neinvazivním laboratorním testem pro diagnostiku recidivy nádoru močového měchýře.

Metodika: Autoři předkládají výsledky ze souboru 64 pacientů postižených recidivou nádoru močového měchýře. Pacientům byly kvantitativně vyšetřeny hladiny cytokeratinů 8 a 18 v moči UBC IRMA[®] testem (*Urinary Bladder Cancer test*). Byla hodnocena schopnost UBC IRMA[®] testu diagnostikovat recidivu uroteliálního karcinomu močového měchýře.

Výsledky: V souboru bylo zjištěno 44 pozitivních vyšetření. Senzitivita testu byla 0,6875 (69 %) a specifita 0,6470 (65 %), nesprávná pozitivita testu 0,3529 (35 %) a nesprávná negativita testu 0,3125 (31 %). Prediktivní hodnota pozitivního testu 0,88. Prediktivní hodnota negativního testu 0,35.

Závěr: V souboru pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře byly prokázány zvýšené hladiny cytokeratinů 8 a 18 oproti populaci bez tohoto onemocnění.

SUMMARY

DIAGNOSIS OF RECURRENT BLADDER CANCER: USE OF IDENTIFICATION
OF CYTOKERATINE 8 AND 18 IN URINE SAMPLE

Objective: Non-invasive diagnosing of malignant diseases is a wish of all physicians. This work presents the group of patients examined by non-invasive laboratory test for diagnosing the recidive of urinary bladder cancer. Method: The authors present the results of the group of 64 patients affected by the recidive of urinary bladder cancer. The qualitative examination of 8 and 18 cytokeratine levels in the urine was made by UBC IRMA[®] test (*Urinary Bladder Cancer test*). There was evaluated the ability of UBC IRMA[®] test to diagnose the recidive of urothelial urinary bladder cancer. Results: 44 positive examinations were found in the group. The sensitivity of the test was 0,6875 (69 %) and the specificity 0,6470 (65%), false positivity of the test 0,3529 (35%) and false negativity of the test 0,3125 (31%). The predictive value of positive test 0,88. The predictive value of the negative test 0,35.

Conclusion: There were demonstrated the increased levels of 8 and 18 cytokeratines in the blood of the group of patients with urothelial urinary bladder cancer compared to the population without this disease.

ÚVOD

Uroteliální karcinom močového měchýře (MM) je druhou nejčastější urologickou malignitou po karcinomu prostaty. Je 6. nejčastějším maligním onemocněním mužské populace (incidence 6,1 %) za bronchogenním karcinomem (20,3 %), za nádorem prostaty (12 %), tlustého střeva (9,2 %), rektosigmoidea (8,4 %), ledviny a ledvinné pánvičky (6,4 %). U žen představuje 11. nejčastější nádorové onemocnění. Incidence tohoto nádoru každým rokem stoupá [1,2,3]. Nejčastějším typem nádoru MM je uroteliální karcinom, který byl sledován v našem souboru. Pro jeho povrchovou formu pTa-pT1 jsou typické vícečetné recidivy 60 – 85 % [3,4]. Nezbytná je proto celoživotní dispenzarizace pacienta a opakované cystoskopické kontroly. V naší práci je publikován soubor nemocných vyšetřených neinvazivním kvantitativním laboratorním testem pro diagnostiku recidivy nádoru MM. Jednalo se o pacienty s cystoskopicky prokázanou recidivou nádoru MM.

CÍL

Autoři předkládají soubor 64 pacientů postižených recidivou nádoru MM. U pacientů byly kvantitativně vyšetřeny hladiny cytokeratinů 8 a 18 UBC IRMA[®] testem (*Urinary Bladder Cancer test*) v nativních vzorcích moči. UBC IRMA[®] test prokazuje hladiny cytokeratinů (CK) 8 a 18 v moči. Byla hodnocena schopnost UBC IRMA[®] testu diagnostikovat recidivu uroteliálního karcinomu MM.

SOUBOR A METODIKA

V období od srpna 1996 do února 2001 byla vyšetřena hladina cytokeratinů 8 a 18 v moči u 64 pacientů s uroteliálním karcinomem pTa-pT4, G I-III MM. V souboru bylo zastoupeno 11 žen (17 %) a 53 mužů (83 %), ve věkovém rozmezí 41 až 88 roků. Průměrný věk pacientů byl 68 roků. Kontrolním souborem byly vzorky moči od 17 pacientů s benigním urologickým onemocněním (adenom prostaty, infekce močových cest apod.), kterým byla též vyšetřena hladina cytokeratinů 8 a 18 v moči UBC IRMA[®] test. V kontrolním souboru bylo 6 žen (35 %) a 11 mužů (65 %), ve věkovém rozmezí 24 až 81 roků, průměrný věk byl 51 roků.

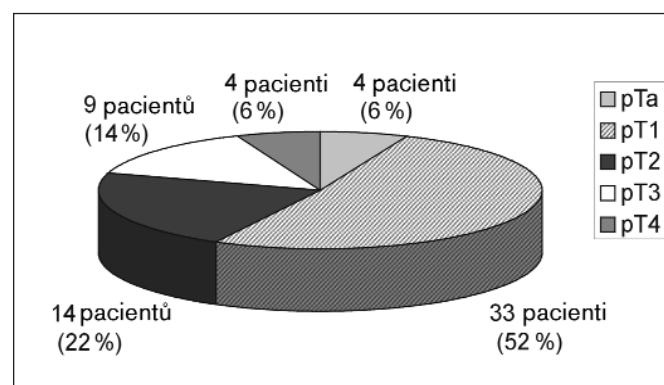
Odebírán byl vždy nativní vzorek ranní moči, močené před cystoskopickou kontrolou. V případě, že byl cystoskopicky potvrzen pozitivní záchyt uroteliálního karcinomu, byl vzorek moči konzervován do 1 hodiny od odběru zmražením na -18 °C do doby dalšího zpracování. Vzorky moči byly následně inkubovány s monoklonální anti-UBC protilátkou značenou izotopem jódu ¹²⁵I a vyšetřeny metodou IRMA (*ImmunoRadioMetric Assay*). 95. percentil pro koncentraci UBC v normální populaci byl výrobcem kitu stanoven na 12 µg/l.

Pacienti s pozitivním kulturačním bakteriálním nálezem v moči nebo pyurií v močovém sedimentu byli ze souboru pacientů s recidivou uroteliálního karcinomu MM vyloučeni.

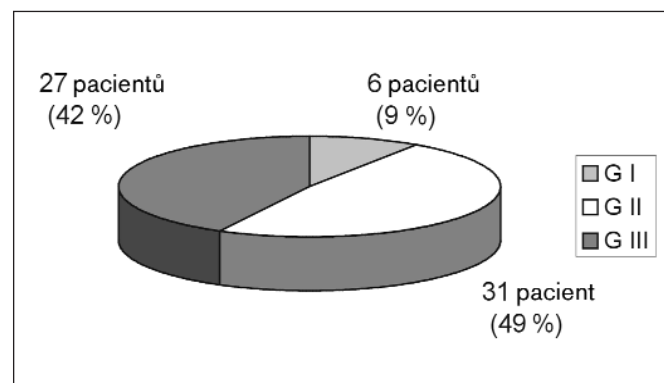
Stanovení UBC bylo provedeno soupravou Ideal[™] Monoclonal UBC[™] IRMA od IDL Biotech AB, Sweden. Jedná se o 2hodinový test, určený pro stanovení fragmentů cytokeratinů 8 a 18 v moči, pocházejících z uroteliálních nádorů typu „sandwich“ stanovením na pevné fázi. V tomto testu jsou vzorky, standardy i kontroly inkubovány s monoklonální anti-UBC protilátkou navázanou na plastické kuličky a současně inkubovány s protilátkou značenou I¹²⁵. Během inkubace dvojice imobilizované a radioizotopem značené protilátky váže antigen a vytvoří *sandwich*. Následně

jsou kuličky promyty a je měřena radioaktivita gama-počítačem. Naměřená radioaktivita je přímo úměrná koncentraci analytu. Test je určen pouze pro *in vitro* vyšetření moči. Správnost a reprodukovatelnost stanovení souvisí s dodržením postupu a přesností pipetování předepsaných objemů. Vzorky moči před vyšetřením mohou být zmraženy a jsou stabilní po dobu 2 měsíců při -18 °C. Před testováním je nutno nechat vyšetřované vzorky moči vytemperovat na pokojovou teplotu. Menší zákal vzorku moči neovlivňuje výsledky.

Ze sledovaného souboru 64 pacientů s nádorem MM byli dle TNM klasifikace hodnoceni 4 pacienti jako stupeň pTa, 33 pacienti jako stupeň pT1, 14 pacientů jako stupeň pT2, 9 pacientů jako stupeň pT3, 4 pacienti jako stupeň pT4 lokálního rozsahu nádoru (viz graf 1). Nádorový histopatologický *grading* (dále jen *grading*) byl zastoupen následně: G I - 6 pacientů, G II - 27 pacientů a G III - 31 pacientů (viz graf 2).



Graf 1. Dělení pacientů ve sledovaném souboru dle lokálního rozsahu nádoru.



Graf 2. Dělení pacientů ve sledovaném souboru dle histopatologického *gradingu*.

VÝSLEDKY

Patologická hodnota ve zjištěných hladinách cytokeratinů 8 a 18 byla zaznamenána u 44 (69 %) pacientů. V jednotlivých skupinách lokálního rozsahu nádoru TNM klasifikace byly naměřené hodnoty patologické u 2 ze 4 pacientů (50 %) pro pTa, u 23 z 33 pacientů (69 %) pro pT1, u 11 ze 14 pacientů (79 %) pro pT2 a u 8 z 13 pacientů (61 %) pro pT3 a pT4 (viz graf 3). V jednotlivých skupinách *gradingu* nádorů byl vztah mezi patologickou

hodnotou a stupněm *gradingu* následující. V případě G I byly patologické hodnoty u 4 (67 %) pacientů, G II u 23 (76 %) pacientů a v případě G III u 17 (65 %) pacientů (viz graf 4). Hladiny CK nebyly přepočítávány na hladinu kreatininu, byly použity získané absolutní hodnoty hladin cytokeratinů.

Statistické vyhodnocení naměřených hodnot, získání základních údajů deskriptivní statistiky bylo provedeno pomocí statistického softwarového programu NCSS (2001), Fisherův přesný test shody proporcí. Při statistickém zpracování výsledků byla stanovena senzitivita testu (pravděpodobnost, že bude test pozitivní u pacientů se sledovaným nádorem) 0,6875 (69 %). Specifita testu (pravděpodobnost, že test bude negativní u pacientů bez nádorového onemocnění) byla zjištěna 0,6470 (65 %), nesprávná pozitivita testu 0,3529 (35 %) a nesprávná negativita testu 0,3125 (31 %). Prediktivní hodnota pozitivního testu (pravděpodobnost, že je osoba opravdu nemocná, když test reagoval pozitivně) byla 0,88. Prediktivní hodnota negativního testu (pravděpodobnost, že osoba nemá sledovanou nemoc při negativním výsledku testu) byla 0,35. Pokud by byla tato vyšetřovací metoda použita ke *screeningu*, je nutno vzít do úvahy i prevalenci nádoru MM v populaci.

V kontrolním souboru náhodně vybraných 17 pacientů s benigním urologickým onemocněním byly naměřené hodnoty u 11 pacientů (65 %) v normálním rozmezí a u 6 pacientů (35 %) byly v rozmezí patologickém. Z pacientů s patologickou hodnotou měl významně zvýšenou hladinu cytokeratinů pacient s akutní infekcí močových cest a pacientka s endometriózou v močovém

měchýři. Ostatní zvýšené hodnoty hladin cytokeratinů byly zvýšeny jen mírně nad referenční hladinou pro normu. Jednalo se o pacienty s infekcí močových cest. *Cut off* hodnoty uvedené výrobcem UBC IRMA[®] testu bylo využito jako normy v běžné zdravé populaci.

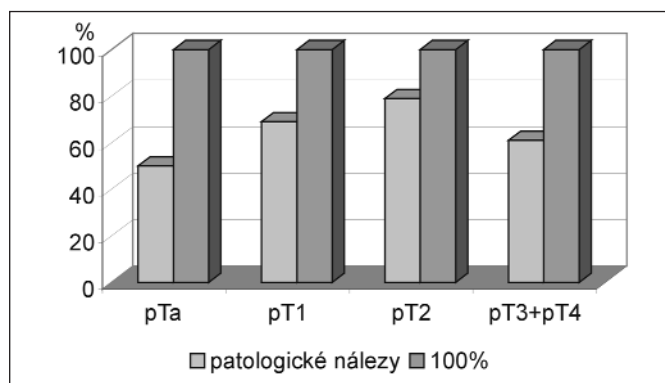
DISKUSE

Současný stav diagnostiky nádorů močového měchýře je charakterizován rychlým pokrokem v oblasti imunohistochemie. Nové poznatky z oblasti buněčné stavby, metabolismu a z oblasti molekulární biologie zpřesňují poznání patogenese nádorových onemocnění a umožňují cílenější a přesnější diagnostiku probíhajících procesů. Podařilo se izolovat proteiny, enzymy a degradační produkty charakteristické pro nádory močového měchýře [14,15,17,18].

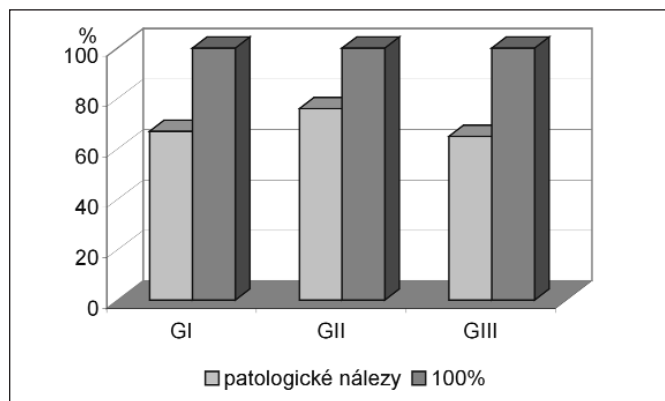
Cytokeratiny (CK) tvoří mikrofilamentární mezičlánek buněčného cytoskeletu. Udržují tvar a podobu buněk. Doplnějí se a spolupůsobí s desmosomy, mezibuněčnými můstky v epitelu [5]. CK jsou ve vodných roztocích nerozpustné, uvolňují se do moči při destrukci buňky. Detekovatelné jsou pouze jejich solubilní fragmenty. CK lze rozdělit do 2 skupin, na acidické a bazické. Průkaz CK v systémovém krevním oběhu přichází v úvahu jen při systémové diseminaci onemocnění. V lidské populaci bylo určeno 20 jednotlivých izotypů CK. U epitelálních buněk se dá obvykle prokázat 2 – 10 izotypů CK [6]. CK 4 je typicky exprimován z bazálních buněk, CK 7, 8, 13, 18, 19, 20 jsou exprimovány buňkami urotelu. CK 8, 18, 19, 20 se objevují na povrchu buněk u karcinomu MM [7,8,9,10]. CK 20 je popisován jako průkaz recidivujícího nádoru [6]. Během destruktivní lýzy buněk uroteliálního karcinomu se CK 18 a CK 19 uvolňují do moči a krve, kde mohou být zjištěny [11]. CK mohou být prokazovány různými testy, např. UBC IRMA[®] test (*Urinary Bladder Cancer test*, prokazuje CK 8 a 18), UBC ELISA[®] test, UBC Rapid[®] test, TPA (*Tissue Polypeptide Antigen test*, prokazuje CK 8,18,19), CYFRA 21-1 (prokazuje CK 19) [6,7,11,12,13,14,15,16].

Nejčastěji používaným neinvazivním vyšetřením na přítomnost nádorových buněk urotelu je cytologie prováděná z moči pacientů. Její vypovídací schopnost je omezená u nádorů s nízkým *gradingem*. Právě v této oblasti diagnostiky je potenciální místo pro uplatnění dalších neinvazivních vyšetřovacích a diagnostických postupů, např. využití stanovení různých nádorových markerů. V lékařské praxi neexistuje stoprocentně senzitivní a specifický test. Stejně tomu tak je i u diagnostických testů na přítomnost nádoru urotelu.

Většina současných testů má v diagnostice vysokou senzitivitu a nízkou specifitu. Sanchez-Carbayo et al ve svých publikovaných souborech dokládají senzitivitu UBC ELISA[®] testu 87 % a specifitu testu 86 % v případě stanovení normální hladiny množství cytokeratinů na 9,74 ug/l, tedy o cca pětinu nižší hodnotu než výrobcem doporučované. Jednoznačně lze tímto postupem zvýšit senzitivitu testu, ale na úkor jeho specificity. Ciudad et al zjistili senzitivitu UBC testu 77 %. Heicappell et al vyšetřili cytokeratiny 8 a 18 UBC testem a zjistili senzitivitu testu od 21,6 % (pTa) do 75 % (pT4), celkovou specifitu 76,6 % a nedoporučili jej ke klinické detekci karcinomu měchýře. Shuhei et al uveřejnili ve svém souboru zjištěnou senzitivitu UBC ELISA[®] testu 82 % a specifitu též 82 %. Porovnáním se současně prováděnou cytologií došli k závěru, že vyšetření UBC testem je mnohem účinnější, a to zejména u nádorů s nízkým *gradingem* [19,20]. Nižší získané hodnoty senzitivity a specifity publikovali Babjuk et al v souborech vyšetřených pacientů UBC IRMA[®] a UBC RAPID[®] testem [9,10,14].



Graf 3. Podíl prokázaných patologických nálezů v jednotlivých kategoriích dle lokálního rozsahu nádoru.



Graf 4. Podíl prokázaných patologických nálezů v jednotlivých kategoriích dělených dle nádorového gradingu.

Pro průkaz karcinomu MM v moči existuje množství dalších laboratorních vyšetřovacích testů monitorujících jiné nádorové markery. Některé z nich uvádíme. Aura-Tek FDP[®] testem jsou prokazovány fibrin degradační produkty, jejichž hladiny stoupají v případě přítomnosti karcinomu MM. BTA[®] testem, proveditelným ambulantně, jsou prokazovány komplexy bazální membrány. Vyšetřujeme jím lidský komplementový faktor H odvozený protein (hCFHrp). BTA TRAK[®] testem prokazujeme hCFHrp kvantitativně. ImmunoCyt[®] testem prokazujeme monoklonální protilátky proti specifickým antigenům buněk uroteliálního karcinomu. MAUS[®] testem (*Mikrosatelite Analysis of Urine Sediment*) metodou PCR prokazujeme genomickou nestabilitu buněk. NMP22[®] testem je vyšetřována hladina proteinu jaderného mitotického aparátu. Žádný z uvedených testů dostatečně ve své senzitivitě a specifitě nepřevyšuje ostatní natolik, aby mohl být doporučen jako jediný možný. Nevýhodou navíc bývá metodická a časová náročnost jejich zpracování.

ZÁVĚR

Po shrnutí výsledků u souboru pacientů s uroteliálním nádorem MM, sledovaném autory článku, byly prokázány zvýšené hladiny cytokeratinů 8 a 18 oproti populaci bez tohoto onemocnění. UBC IRMA[®] test však v uvedeném souboru neměl dostatečnou senzitivitu a specifitu potřebnou k diagnostice a dispenzarizaci uroteliálního karcinomu MM. Jeho praktické využití by mohlo být uplatněno v kombinaci s dalšími testy založenými na jiném principu diagnostiky. Tím by mohlo být dosaženo zlepšení obou parametrů - senzitivity i specifity. K potvrzení tohoto předpokladu jsou nutné další studie.

Pro získání validních výsledků je vždy nezbytné klinické zhodnocení symptomů a stavu pacienta, které umožní správně interpretovat získané hodnoty. Z našich zkušeností se jednalo zejména o nesprávně pozitivní výsledky u pacientů s infekcí močových cest. Pro *screeningové* vyšetřování je UBC IRMA[®] test nevhodný.

Předpokládáme rozšíření našeho souboru o výsledky pacientů s nádorem MM vyšetřených průtokovou cytometrií na expresi CK 18 na buňkách ve vzorcích moči, které v současné době dokončujeme. Účinnost neinvazivních testů v diagnostice nádorů močového měchýře by zobjektivovaly početně větší prospektivní studie na heterogenních souborech pacientů.

LITERATURA

1. Novotvary 1999 ČR. ÚZIS ČR 2001 Praha: 51.
2. Wingo PA, Tong T, Bolden R. Cancer statistics 1995. CA 1995; 45: 8.
3. Dvořáček J et al. Urologie. Praha, ISV 1998: 965-971.
4. Ro JY, Staerckel GA, Ayala AG. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. Urol Clin North Am 1992; 19 (3): 435-453.
5. Liebert M, Gebhardt D, Wood C et al. Urothelial differentiation and bladder cancer. Adv Exp Med Biol 1999; 462: 437-448.
6. Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz LK. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: A review of the biological and diagnostic implications. Histol Histopathol 1999; 14: 657-664.
7. Moll R, Achtstatter T, Becht E et al. Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. Maintenance of expression of urothelial differentiation features in transitional cell carcinomas and bladder carcinoma cell culture lines. Am J Pathol 1988; 132: 123-144.
8. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol 1992; 140: 427-447.
9. Babjuk M, Košťířová M, Mudra K et al. Stanovení proteinu blízkého faktoru H komplementu (BTA TRAK a BTA STAT), fragmentů cytokeratinů 8 a 18 (UBC IRMA a UBC Rapid) a cytologie moči při neinvazivní detekci nádorů močového měchýře. Česká urologie 2001; 5: 4-8.
10. Babjuk M, Košťířová 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. Eur Urol 2002; 41(1): 34-9.
11. Ku NO, Liao J, Chou CF, Omary MB. Implications of intermediate filament protein phosphorylation. Cancer Metast Rev 1996; 15: 429-444.
12. Soloway MS, Bringman JV, Caprinito G et al. 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. J Urol 1996; 156: 363-367.
13. Oshima RG, Baribault H, Caulin C. Oncogenetic regulation and function of cytokeratins 8 and 18. Cancer Metast Rev 1996; 15: 445-471.
14. Retz M, Lehmann J, Roder C et al. Cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction as a new tool for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow of bladder cancer patients. Eur Urol 2001; 507-517.
15. Stieber P, Schmeller N, Schambeck C et al. Clinical relevance of CYFRA 21-1, TPA-IRMA and TPA-LIA-mat in urinary bladder cancer. Anticancer. Res 1996; 16: 3793-3798.
16. Babjuk M, Košťířová M, Mudra K et al. Místo neinvazivních testů (BTA STAT, BTA TRAK, UBC RAPID, UBC IRMA) a cytologie při sledování pacientů s povrchovými nádory močového měchýře. Česká urologie 2001; 5: 9-13.
17. Brandau Boehle A. Bladder cancer. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. Eur Urol 2001; 5: 491-497.
18. Kausch I, Boehle A. Bladder cancer. molecular aspects and diagnosis. Eur Urol 2001; 5: 498-506.
19. Shuhei: Kyoko A, Satoshi K, Ken-ichiro Y. Preliminary report of the clinical performance of a new urinary bladder cancer antigen test: comparison to voided urine cytology in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. Clin Chim Acta 2000: 111-120.
20. Sánchez-Carbayo M, Megías J, Molina R et al. UBC, a new tumormarker in the diagnosis of bladder cancer. Abstract ISOBM, Sweden Umea 1998: 17.

MUDr. Miroslav Louda
Urologická klinika FN a LF UK
Sokolská třída
500 05 Hradec Králové
e-mail: louda@lfhk.cuni.cz