

Stanovení koncentrace survivinu a livinu v séru či moči a efektivní diagnostika karcinomu močového měchýře

Stejskal D.¹, Fiala R.²

¹Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk

²Urologická klinika Fakultní nemocnice Olomouc

SOUHRN

Cíl práce: Hodnocení stanovení koncentrace survivinu a livinu v moči a séru u jedinců s karcinomem močového měchýře. Survivin a livin jsou inhibitory apoptózy, které hrají významnou roli ve změnách buněčného cyklu při maligním bujení.

Typ studie: Prospektivní studie.

Název a sídlo pracoviště: Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk; Urologická klinika Fakultní nemocnice Olomouc.

Materiál a metody: Vyšetřili jsme 96 osob, z toho 64 jedinců s prokázaným karcinomem močového měchýře nebo karcinomem močového měchýře v anamnéze a 32 osob s benigním urologickým onemocněním. U všech byla provedena cystoskopie a stanovení koncentrace survivinu a livinu v krvi i moči (R&D, USA, ELISA).

Výsledky: Survivin a livin v moči – ani jeden z vyšetřených jedinců neměl měřitelné hodnoty survivinu nebo livinu, a to ani v případě, že byla mez detekce snížena na hodnoty 100 ng/l pro survivin a 30 ng/l pro livin. Survivin a livin v séru – ani jeden z pacientů neměl ani měřitelné hodnoty livinu v séru. Pouze dva pacienti měli měřitelné hodnoty survivinu v séru; ani v jednom případě nešlo o pacienty s karcinomem močového měchýře.

Závěr: Stanovení koncentrací survivinu a livinu v séru a moči (ELISA) nelze využít k diagnostice pacientů s karcinomem močového měchýře.

Klíčová slova: survivin, livin, apoptóza, karcinom močového měchýře, cystoskopie.

SUMMARY

Stejskal D., Fiala R.: Determination of the concentration of survivin and livin in serum or urine and the effective diagnostics of bladder cancer

Objective: Evaluation of livin and survivin measurement in sera and urine in individuals with bladder cancer. Apoptosis inhibitors survivin and livin play a critical part in cell cycle progression of cancer.

Design: Prospective study.

Setting: Department of Laboratory Medicine, Hospital Šternberk; Urology Clinic, Faculty Hospital Olomouc.

Material and Methods: We tested 64 patients with verified documentation cancer or bladder cancer in anamnesis and 32 patients with benign urological diseases. Cystoscopy and blood and urine measurement of survivin and livin concentration were performed in all of probands (R&D, USA, ELISA).

Results: Urine survivin and livin concentrations were not detectable in both groups even if detection limit of survivin and livin was reduced to 100 ng/l for survivin and 30 ng/l for livin.

Serum survivin and livin: Livin was not detectable in the serum in all patients. Only two individuals had measurable serum survivin values but they had other diagnosis than bladder cancer.

Conclusion: Survivin and livin concentration measurement in serum and urine (ELISA) are not able to get diagnosis in patients with bladder cancer.

Key words: survivin, livin, apoptosis, bladder cancer, cystoscopy.

Úvod

Uroteliální karcinom močového měchýře je onemocnění s variabilním klinickým průběhem, které téměř u 60 % pacientů vykazuje tendenci k časnému relapsu [1].

Při diagnostice a dispenzarizaci pacientů s nádory močového měchýře jsou standardními diagnostickými postupy cystoskopie a cytologie. Cytologické vyšetření může být zatíženo subjektivní chybou a je závislé na bezchybném zpracování vzorku; výsledky bývají k dispozici nejdříve za 24 hodin a mají poměrně nízkou specifitu (40–60 %) [2]. Cystoskopické vyšetření je pro pacienta nepříjemné a zatěžující.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem se hledají nové přístupy, které by umožnily diagnostikovat

s uspokojivou efektivitou přítomnost nádorů močového měchýře.

Velký počet studií se zaměřuje na stanovení vybraných laboratorních ukazatelů v moči nebo krvi, jejichž přítomnost nebo určitá koncentrace by mohla být dostatečně efektivní pro diagnostiku přítomnosti tumoru močového měchýře nebo by mohla poskytnout informaci k výběru adjuvantní terapie [3, 4].

Nedávno byly publikovány zkušenosti s vyšetřením řady laboratorních ukazatelů, do kterých byly vkládány poměrně velké diagnostické naděje (TPS, BTA, telomeráza, NMP22, M344, hodnocení aneuploidie chromosomů 3, 7, a 17 a ztrátu lokusu 9p21 metodou fluorescenční *in situ* hybridizace, Immunocyt test atp.). První závěry zmíněných studií sice hovořily o snížení frekvence cystoskopií při uspokojivé diagnostické efektivitě.

vitě stanovení těchto ukazatelů, další práce však předběžné závěry nepotvrdily. Nepodařilo se prokázat, že by tyto ukazatele mohly nahradit cystoskopické vyšetření, pouze ve vybraných případech ho doplňovaly [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 22, 36].

V poslední době se hovoří o možnosti stanovení exprese inhibitorů apoptózy, survivinu a livinu v moči, která má excelentní diagnostickou efektivitu pro diagnostiku karcinomu močového měchýře. Nejasná situace však zůstává ohledně diagnostické efektivnosti stanovení koncentrace těchto proteinů. Z uvedeného důvodu jsme si položili otázku, zda lze při stanovení koncentrace survivinu a livinu v moči a séru diagnostikovat přítomnost karcinomu močového měchýře, respektive zda může tato analýza nahradit cystoskopické a cytologické vyšetření.

Materiál a metody

Do studie bylo zařazeno celkem 100 pacientů Urologické kliniky FN Olomouc. Z nich hodnotitelných bylo 96, z toho 57 mužů a 39 žen. Průměrný věk byl 65,1 roku (v rozmezí 19–94 roků).

Soubor pacientů

96 pacientů bylo rozděleno do tří skupin. Do první skupiny bylo zařazeno 41 pacientů, kteří měli cystoskopicky prokázaný a posléze histologicky potvrzený tumor močového měchýře. Ani jeden z nich neměl v anamnéze radioterapii lokální či systémovou chemoterapii. Do druhé skupiny bylo zařazeno 23 nemocných, kteří měli v anamnéze histologicky prokázaný karcinom a v době odběru moče měli negativní cystoskopii i cytologii. Do třetí skupiny 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 přidání kapky Antilysinu a separaci v chlazené centrifuze a zamražení transportována na Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk, p. o., kde byla uložena při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro následné stanovení koncentrace survivinu a livinu.

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

Stanovení survivinu

Vyšetření bylo provedeno metodou ELISA, soupravou firmy R&D (USA, Michigan) po předchozí validaci soupravy (CV v sérii, $n = 10$, 7,2 %; CV mezi sériemi,

$n = 10$, 9 % hodnoty; v moči byly u vybrané skupiny pacientů se záněty urotraktu nad mezí detekce). Jako měřicí systém byla použita linka Marc002+Max (Dynatech), která byla dodavatelem řádně validována.

Výsledky však byly u řady pacientů nižší než mez detekce metody, proto byla po konzultaci s vývojovým střediskem firmy Biovendor laboratorní medicína, a. s. (www.biovendor.com) snížena citlivost na 100 ng/l.

Stanovení livinu

Vyšetření bylo provedeno metodou ELISA, soupravou firmy R&D (USA, Michigan) po předchozí základní validaci soupravy (CV v sérii, $n = 10$, 4,2 %; CV mezi sériemi, $n = 10$, 8,2 %; hodnoty v moči byly u vybrané skupiny pacientů se záněty urotraktu nad mezí detekce).

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

Výsledky však byly u řady pacientů nižší než mez detekce metody, proto byla po konzultaci s vývojovým střediskem firmy Biovendor laboratorní medicína, a. s. (www.biovendor.com) snížena citlivost na 30 ng/l.

Statistické zpracování

Ke statistickému zpracování měl být použit software Medcalc (Belgie).

Výsledky

V moči se nepodařilo nalézt měřitelnou hodnotu survivinu a livinu ani u jednoho nemocného ze všech, ač byla předtím (při validaci soupravy) u pacientů v různých stavech námi stanovena (šlo o jedince se známými záněty urotraktu, respektive systémového zánětu).

I při snížení meze detekce se nepodařilo nalézt u vyšetřených skupin pacientů měřitelné hodnoty.

Také v séru byly všechny hodnoty survivinu pod mezí detekce ve všech skupinách pacientů. Pouze dva pacienti z třetí skupiny měli hodnoty zvýšené. Pacient se sklerózou hrdla močového měchýře měl koncentraci survivinu 54,3 $\mu\text{g/l}$ a pacient s ureterolitiazou 1316 $\mu\text{g/l}$.

Všichni sledovaní jedinci měli hodnoty livinu v séru pod mezí detekce.

Diskuse

Nedávno bylo potvrzeno, že při nádorovém bujení hrají významnou roli proteiny, které se nazývají inhibitory apoptózy. U člověka bylo popsáno 6 typů těchto proteinů: HIAP-1, HIAP-2, XIAP, NIAP, survivin a livin [19, 24, 25, 29].

Zvýšená exprese survivinu byla opakovaně potvrzena u mnoha typů nádorů (prs, střeva, slinivka, prostata, neuroblastom, melanom, non-Hodgkinský lymfom, žaludek, melanom, neuroblastom, močový měchýř atp.) [11–15]. Tento protein bývá omezeně exprimován i v normální tkáni. Byla také prokázána pozitivní sou-

vislost mezi expresí survivinu a progresí onemocnění [4, 14, 15, 16, 17].

Nedávno bylo popsáno, že jedinci s karcinomem močového měchýře mají zvýšenou expresi livinu v tkáních karcinomu i moči; exprese livinu byla z hlediska diagnostiky efektivnější než exprese survivinu, a to v případech hledání pacientů s možným relapsem tumoru [18–20].

Senzitivita i specifická exprese survivinu i livinu pro karcinom močového měchýře vykazovaly v pilotních pracích významně vyšší hodnoty než diagnostická efektivita jiných ukazatelů (pohybovaly se mezi 95 až 100 %) [2, 4, 15, 16, 17, 19, 20, 24].

Stanovení koncentrace survivinu v moči a séru však bylo popsáno pouze v několika málo publikacích; v řadě případů není zřetelně definovaná měřicí technika [33] a na rozdíl od výsledků se stanovením jejich exprese jde o závěry velice rozporuplné a protirečící si. Diskrepance ve výsledcích různých autorů je pravděpodobně daná rozdílnou měřicí technikou, technologií analýzy (využití nejrůznějších „in house metod“), chyběním standardizace měření a současně také designem použitých studií [4, 29, 34, 35].

V dostupné literatuře (např. citace portálu PubMed) nebyla v době popisování závěrů této práce známa žádná informace o možnostech nebo zkušenostech s měřením koncentrace livinu v biologických tekutinách. Existují pouze zmínky o výskytu protilátek proti tomuto proteinu u pacientů s řadou maligních chorob.

Vzhledem k tomu, že se nám podařilo od uznávaného výrobce získat soupravu na stanovení obou proteinů, v kontextu s informacemi odborné literatury jsme zahájili tento projekt. Naše očekávání byla navíc podpořena uspokoivými analytickými charakteristikami obou diagnostických souprav, které jsme zjistili při jejich validaci. Podle našeho názoru, v souladu s některými recentními publikacemi, nelze stanovení koncentrace těchto proteinů (na rozdíl od měření jejich exprese) využít v diagnostice karcinomů močového měchýře.

Závěrem lze tedy konstatovat, že se nepodařilo prokázat, že je stanovení koncentrace survivinu a livinu za využití metody ELISA použitelné jako diagnostický ukazatel přítomnosti či monitorování léčby karcinomů močového měchýře. Projekt byl z těchto důvodů ukončen.

Literatura

1. **Ozen, H., Hall, M. C.** Bladder cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 2000, 12, p. 255–259.
2. **Sharp, J. D., Hausladen, D. A., Maher, M. G., Wheeler, M. A., Altieri, D. C., Weiss, R. M.** Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis. *Front. Biosci.*, 2002, 7, p. 36–41.
3. **Stein, J. P., Grossfeld, G. D., Ginsberg, D. A.** Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J. Urol.*, 1998, 160, p. 645–659.
4. **Davies, B., Chen, J., Modugno, F. M., Weissfeld J. et al.** Contribution of the prostate limits the usefulness of survivin for the detection of bladder cancer. *J. Urol.*, 2005, 174, p. 1767–1770.
5. **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, p. 80–83.
6. **Fradet, Y., Cordon-Cardo, C.** Critical appraisal of tumor markers in bladder cancer. *Semin. Urol.*, 1993, 11, p. 145–153.
7. **Pode, D., Golijanin, D., Herman, Y.** Immunostaining of Lewis X in cells from voided urine. *J. Urol.*, 1998, 159, p. 389–392.
8. **Sarosdy, M. F., de Vere White, R. V., Soloway, M. S.** Results of multicentric trial using the BTA test to monitor for and diagnosis recurrent bladder cancer. *J. Urol.*, 1995, 154, p. 379–383.
9. **Soloway, M. A., Briggman, J. V., Carpinito, G. A.** 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, p. 363–367.
10. **Friedrich, M. G., Helstern, A., Toma, M. I.** Are false-positive urine markers for the detection of bladder carcinoma really wrong or do they predict tumor recurrence? *Eur. Urol.*, 2003, 43, p. 146–151.
11. **Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D. C.** A novel anti-apoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med.*, 1997, 39, p. 917–921.
12. **Lu, C. D., Altieri, D. C., Tanigawa, N.** Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlates with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer Res.*, 1998, 58, p. 1808–1812.
13. **Grossmann, D., McNiff, J. M., Li, F., Altieri, D. C.** Expression and targeting of the apoptosis inhibitor SURVIVIN in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 1999, 113, p. 1076–1081.
14. **Kawasaki, H., Altieri, D. C., Lu, C. D.** Inhibition of apoptosis by SURVIVIN predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 1998, 58, p. 5071–5074.
15. **Stana, H. S., Grossmann, D., Anthony, J. N.** Tumor content of the antiapoptotic molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1999, 341, p. 452–453.
16. **Smith, S. D., Wheeler, M. A., Plescia, J.** Urine detection of SURVIVIN and diagnosis of bladder cancer. *JAMA*, 2001, 285, p. 324–328.
17. **Moore, M.** Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *J. Insur. Med.*, 2001, 33, p. 202–203.
18. **Ashhab, Y., Alian, A., Polliack, A.** Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett.*, 2001, 495, p. 56–60.
19. **Gazzaniga, P., Grafikone, A., Giuliani, L., Gandini, O., Silvestri, I. et al.** Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann. Oncol.*, 2003, 14, p. 85–90.
20. **Kasof, G. M., Gomes, B. C.** Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, p. 3238–3246.
21. **Sarosdy, M. F., Hudson, M. A., Ellis, W. J.** Improved detection of recurrent bladder cancer using the BARD BTA stat test. *Uro.*, 1997, 50, p. 349–353.
22. **Sozen, S., Biri, H., Sinik, Z.** Comparison of the Nuclear Matrix Protein 22 with voided urine cytology and BTA stat test in the diagnosis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur. Urol.*, 1999, 36, p. 225–229.
23. **Stampfer, D. S., Carpinito, G. A., Rodriguez, J.** Evaluation of NMP22 in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 1998, 159, p. 394–398.

24. **Lehner, R., Lucia, M. S., Jarboe, E. A., Orlicky, D., Shroyer, A. L., McGregor, J. A., Shroyer, K. R.** Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2002, 10, p. 134-138.
25. **Deveraux, Q. L., Reed, J. C.** IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 1999, 13, p. 239.
26. **Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sanchez, J. J., Maestre, J.** A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small cell lung cancers. *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17, p. 2100.
27. **Satoh, K., Kaneko, K., Hirota, M., Masamune A., Satoh, A., Shimosegawa, T.** Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer*, 2001, 92, p. 271.
28. **Adida, C., Berrebi, D., Peuchmar, M., Reyes-Mugica, M., Altieri, D. C.** Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*, 1998, 351, p. 882.
29. **Ku, J. H., Kwak, C., Lee, H. S., Park, H. K., Lee, E., Lee, S. E.** Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 2004, 171, p. 631–635.
30. **Kato, J., Kuwabara, Y., Mitani, M., Shinoda, N., Sato, A., Toyama, T.** Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 2001, 95, p. 92.
31. **Lokeshwar, V. B., Hautmann, S., Schroeder, G. L.** HA-Hase test: Non-invasive accurate urine test for monitoring bladder cancer recurrence. *Eur. Urol.*, A 2000, 37, p. 367.
32. **Nakanishi, K., Tominaga, S., Hiroi, S., Kawai, T., Aida, S. et al.** Expression of survivin does not predict survival in patients with transition cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows. Arch.*, 2002, 44, p. 559–563.
33. **Sun, Y., He, H., Ma, Q., Wang, X. Y., Yang, L., He, D. L.** Clinical evaluation of BTastat, NMP22, HA, survivin, CD44v6, vEGF and VUC in bladder cancer diagnosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*, 2005, 14, p. 2507–2512.
34. **Davies, B., Chen, J., J., McMurry, T.** Efficacy of BTA stat, cytology, and survivin in bladder cancer surveillance over 5 years in patients with spinal cord injury. *Urology*, 2005, 66, p. 908–911.
35. **Ohsawa, I., Nishimura, T., Kondo, Y., Kimura, G., Satoh, M., Matsuzawa, I., Hamasaki, T., Ohta, S.** Detection of urine survivin in 40 patients with bladder cancer. *J. Nippon. Med. Sch.*, 2004. 71, p. 379–383.
36. Informace o nových ukazatelích na karcinomu močového měchýře na <http://www.ctccomm.com/Publishing/uro/uross0304bladdercancer.htm>

Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR pod číslem NR/8442.

Do redakce došlo 19. 12. 2005.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. D. Stejskal, Ph.D.
Jívavská 20
785 16 Šternberk
e-mail: david.stejskal@quick.cz