

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### STANOVENÍ KONCENTRACE *N,N'*-DIACETYLSPERMINU V MOČI NOVOU METODOU ELISA

DAVID STEJSKAL<sup>a</sup>, VIERA HUMENANSKÁ<sup>c</sup>,  
RADOVAN VRTAL<sup>d</sup>, PAVLÍNA SOLICHOVÁ<sup>a</sup>,  
MICHAL KARPÍŠEK<sup>b</sup>, MARTIN PETZEL<sup>e</sup>  
a MAREK ŠVESTÁK<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Oddělení laboratorní medicíny Nemocnice Šternberk o.z.,  
Středomoravská nemocniční a.s. Jívavská 20, 785 16  
Šternberk, ČR <sup>b</sup> Veterinární a farmaceutická fakulta Brno,  
ČR, <sup>c</sup> Gnosis s.r.o., Slovensko, <sup>d</sup> Urologická klinika FN LF  
UP Olomouc, ČR, <sup>e</sup> Gynekologicko porodnická klinika FN  
Ostrava Poruba, ČR  
david.stejskal@nemstbk.cz, michal.karpisek@email.cz,  
humenanska@biovendor.cz, radovan.vrtal@yahoo.com,  
m.petzcel@seznam.cz

Došlo 17.12.07, přijato 10.4.08.

Klíčová slova: ELISA, *N,N'*-diacetylspermin, karcinom  
močového měchýře

#### Úvod

Buněčný růst závisí na dostatečné dodávce polyaminů, která ovlivňuje jejich biosyntézu, katabolismus i výdej; tento proces je zpětně kontrolován obsahem polyaminů v buňkách. Biosyntézu a transport polyaminů kontrolují především enzymy ornithindekarboxylasa (EC 4.1.1.19) a *S*-adenosylmethionindekarboxylasa (EC 4.1.1.507); jejich katabolismus a export z buněk je naopak kontrolován spermidin/spermin *N*<sup>1</sup>-acetyltransferasou. Zvýšenou biosyntetickou aktivitu polyaminů lze nalézt typicky u neoplastického buněčného růstu<sup>1–4</sup>. *N,N'*-diacetylspermin (DAC; acetamid, *N,N'*-[butan-1,4-diylbis(iminopropan-3,1-diyl)]diacetamid) je obsažen v polyaminech lidské moči. Exkrece tohoto diacetylpolyaminu bývá zvýšena u osob s řadou maligních nádorů (prostata, prs, tlusté střevo, atp.). Remise maligního onemocnění je přítom typická poklesem močového diacetylpolyaminu na normální hodnoty. Zdá se, že DAC je víc senzitivní než běžně používané onkomarkery, např. karcioembryonální antigen (CEA), sacharidové antigeny (Ca 19-9, Ca 15-3), především pro detekci karcinomu tlustého střeva a prsu<sup>5,6</sup>. Je možné, že DAC účinně deteguje maligní choroby v časných stádiích, kdy jiná vyšetření selhávají, a může sloužit jako prognostický marker i ukazatel recidivy řady

tumorů (prostata, urogenitální trakt, játra, žaludku, střevo, atp.)<sup>1–6</sup>.

Jelikož nebyly zatím publikovány informace o významu stanovení DAC v moči jako ukazatele přítomnosti karcinomu močového měchýře, stalo se cílem naší práce navrzení, sestavení a validování testu ELISA pro rychlé stanovení DAC a ověření efektivitu tohoto testu u pacientů s karcinomem močového měchýře.

#### Experimentální část

Vývoj metody ELISA pro stanovení  
*N,N'*-diacetylsperminu v lidské moči

Byla vytvořena kompetitivní imunoanalytická metoda na kvantitativní stanovení lidského *N,N'*-diacetylsperminu v moči s využitím antigenu značeného enzymem.

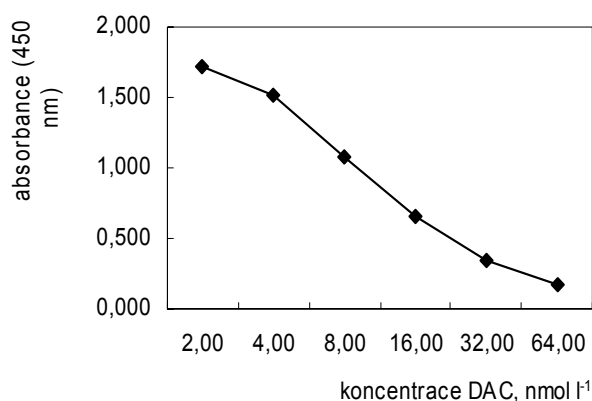
V mikrotitrační desce (Corning Costar, High Binding, katalogové číslo 52-00-02) bylo navázáno 0,5 µg protilátky anti-diacetylspermin (Yamasa corporation, Diagnostics department) na 1 jamku v 0,1 M hydrogenuhličitanovém pufru o pH 8,5 (následovala inkubace 12 h při 4 °C) a po odsátí roztoku byla deska zablokována roztokem TBS (Tris Buffered Saline, pH 7,2), 4 % sacharosa (dávkováno 0,2 ml/jamku, inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 20× ředěného močového vzorku (všechna měření byla prováděna 2×) a následně bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml antigenu *N*-acetylsperminu (Yamasa corporation, Diagnostics department), který byl značen křenovou peroxidasou (HRP) a deska byla inkubována 2 h na třepače pro mikrotitrační desky (TECAN Columbus plus, 300 rpm) při teplotě 25 °C. Po 3-násobném promytí desky promývacím roztokem (TBS; 0,05 % Tween 20, pH 7,2) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 20 min při teplotě 25 °C. Reakce byla zastavena přidáním 0,1 M roztoku kyseliny sírové a vzniklé žluté zbarvení (produkt) byl změřen fotometricky při vlnové délce 450 nm, přičemž intenzita žlutého zbarvení byla nepřímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Hodnoty DAC v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky, která byla získána vnesením absorbancí standardů oproti jejich známé koncentraci (obr. 1).

Ředícím roztokem pro standardy, vzorky a antigen značený křenovou peroxidasou byl roztok TBS (Tris Buffered Saline, pH 7,2), 0,01 % Thimerosal. V testu byla použita sada standardů o koncentracích 64, 32, 16, 8, 4 a 2 nmol l<sup>-1</sup>, připravená naředěním chemicky syntetizovaného lidského *N,N'*-diacetylsperminu (Yamasa corporation

Tabulka I  
Koncentrace diacetylsperminu v moči u testovaných osob

| Ukazatel | Aritmetický průměr | Medián | Směrodatná odchylka | Rozložení dat | RR                          | n  |
|----------|--------------------|--------|---------------------|---------------|-----------------------------|----|
| DAC-A    | 303,1              | 171,5  | 391,8               | abnormální    | A-B; $P = 0,5$ ; $Z = 0,64$ | 36 |
| DAC-B    | 353,3              | 143,8  | 743,3               | abnormální    |                             | 30 |

DAC-A – hodnoty diacetylsperminu u osob s karcinomem močového měchýře, DAC-B – hodnoty diacetylsperminu v moči u osob s benigním urologickým onemocněním, RR – významnost rozdílu mezi skupinou A a B, (hodnoceno pomocí Mannova-Whitneyova testu)



Obr. 1. Standardní kalibrační křivka pro stanovení diacetylsperminu v moči metodou ELISA

on, Diagnostics department). Močové vzorky byly ředěny 1:19 ředicím roztokem (Biovendor dilution buffer).

#### Klinické testování metody ELISA

Byly vyšetřeny dvě skupiny jedinců, pacientů urologické kliniky FN Olomouc. Do první skupiny bylo zařazeno 36 pacientů Urologické kliniky FN Olomouc s diagnózou karcinomu močového měchýře (endoskopická a následně histologická verifikace). Do druhé skupiny bylo

zařazeno 30 osob s benigním urologickým onemocněním a negativní anamnézou tumoru. U všech byla vyšetřena hladina DAC v moči.

## Výsledky

### Analytická charakteristika metody ELISA

Nebyla zjištěna reaktivita s rekombinantním N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-diacetylspermidinem (ELISA, BioVendor-Laboratorní medicína a.s.). Pro ověření funkčnosti testu byla verifikována správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přidavku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace DAC. Vzorky moče od 2 pacientů byly obohaceny o +16, +8 a +2 nmol l<sup>-1</sup> DAC. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 105 %. V testu linearit byly testovány dva vzorky moče, které byly sériově ředěny ředicím roztokem, který obsahoval TBS a 0,01 % Thimerosal (viz výše) 10×, 20×, 40× a 80×, přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 104 %.

Přesnost metody byla testována jako reprodukovatelnost výsledků u 2 vzorků moče a vyjádřena jako variační koeficient v sérii (n = 8) i mezi sériemi měření (n = 6). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech < 6 %.

Mez stanovitelnosti metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci DAC, činila 0,23 nmol l<sup>-1</sup> (tato

Tabulka II

Pacienti rozdělení podle přítomnosti karcinomu a podle hodnot diacetylsperminu v moči (Skupiny: 1 = < 80, 2 = 80–210, 3 = 210–340, 4 = > 40 nmol l<sup>-1</sup>)

|              | < 80 (1)    | 80–210 (2)  | 210–340 (3) | >340 (4)    | Celkem (%)  |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Karcinom ano | 8           | 12          | 6           | 10          | 36 (54,5 %) |
| Karcinom ne  | 7           | 12          | 3           | 8           | 30 (45,5 %) |
| Celkem (%)   | 15 (22,7 %) | 24 (36,4 %) | 9 (13,6 %)  | 18 (27,3 %) | 66 (100 %)  |

$$\chi^2 = 0,13; P = 0,71$$

hodnota je vyjádřením koncentrace DAC, odpovídající absorbcí vypočítané podle vzorce: průměrná absorbance slepého vzorku ( $n = 8$ ) +  $3 \times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku).

Klinické testování výsledků DAC získaných stanovením ELISA

Hodnoty DAC v moči u pacientů s karcinomem močového měchýře se významně nelišily od hodnot DAC u jedinců s benigním urologickým onemocněním (mediány 171,5 vs. 143,8;  $P = 0,64$ ) a efektivita testu pro klinické účely nebyla dostatečná (plocha pod operační křivkou ROC < 0,7) (tab. I, tab. II).

## Závěr

Závěrem lze konstatovat, že byla navržena, sestavena, validována a zavedena do klinické praxe nová metoda ELISA, sloužící ke klinickému testování pro stanovení DAC v moči. Současně je však nutno říci, že nebyly potvrzeny hypotézy o možném rutinním diagnostickém využití DAC v moči v diagnostice pacientů s karcinomem močového měchýře.

## LITERATURA

1. Enjoi M., Nakamuta M., Arimura E.: *Int. J. Biol. Markers* 19, 322 (2004).
2. Sugimoto M., Hiramatsu K., Kamei S.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121, 317 (2007).
3. Kubota S., Yamasaki Z., Yoshimoto M.: *Cancer N.* 56, 1640 (1985).
4. Kee K., Vujcic S., Merali S.: *J. Biol. Chem.* 279, 27050 (2004).
5. Du Z., Hou S.: *J. Urol.* 170, 2000 (2004).
6. Kawakita M., Hiramatsu K.: *J. Biochem.* 139, 315 (2004).

**D. Stejskal<sup>a</sup>, V. Humenanská<sup>c</sup>, R. Vrtal<sup>d</sup>, P. Solichová<sup>a</sup>, and M. Karpíšek<sup>b</sup>, M. Petzel<sup>e</sup>, and M. Švesták<sup>a</sup>**  
(<sup>a</sup> Department of Laboratory Medicine, Hospital, Šternberk, <sup>b</sup> Veterinary Faculty, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic, <sup>c</sup> Gnosis Ltd., Slovakia, <sup>d</sup> Department of Urology, Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic, <sup>e</sup> Faculty Hospital, Ostrava-Poruba, Czech Republic): **ELISA analysis of *N,N*-diacetylspermine in Urine**

A new ELISA method of analysis of *N,N*-diacetylspermine in urine and a test for urinary bladder cancer were developed and validated. However, the compound does not seem to be a useful marker for urinary bladder cancer.