

**Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta**

Studijní program: experimentální chirurgie



MUDr. Pavel Dušek

Aktivita katepsinu B u pacientů s karcinomem močového měchýře

Activity of the cathepsin B in patient with the bladder cancer

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
Prof. MUDr. Marek Babjuk CSc.
Urologická klinika 2.lf UK a FN Motol, Praha

Praha, 2016

Prohlášení: Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 14. 06. 2016

Pavel – Dušek

Podpis

Identifikační záznam:

Dušek, Pavel. *Aktivita katepsinu B u pacientů s karcinomem močového měchýře. [Activity of the cathepsin B in patient with the bladder cancer]*. Univerzita Karlova v Praze, 2. Lékařská fakulta, Urologická klinika UK 2. LF a FN Motol 2016. Školitel Babjuk, Marek.

Seznam zkratek:

ASA skóre	skóre americké anesteziologické společnosti
CIS	carcinoma in situ
CT	výpočetní tomografie
EAU	Evropská urologická společnost
ECOG	hodnocení status performance (Eastern Cooperative Oncology Group)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	„Food and Drug Administration“ (americký úřad pro kontrolu léčiv)
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
Gy	gray = jednotka radiačního záření (1Gy=1joule energie/kg tkáně)
HD chemotherapy	vysoko dávkovaná („high dose“) chemoterapie
IVU	intravenózní urografie
Konkomitantní chemoterapie	souběžně s jinou léčbou podávaná chemoterapie
LUTS	low urinary tract syndrome
MIBC	muscle invasive bladder cancer
NMIBC	non-muscle invasive bladder cancer
NOR	Národní onkologický register
RR	response rates
S-katepsin B	katepsin B v séru
S-pro-katepsin B	pro-katepsin B v séru
TCC	karcinom z přechodného epitelu
Tis	tumor in situ
TURB	transuretrální resekce nádoru měchýře
UIS	ureteroileostomie
U-katepsin B	katepsin B v moči
U-katepsin B/kreatinin	katepsin B v moči adjustovaný na kreatinin v moči
U-pro-katepsin B	pro-katepsin B v moči
U-pro-katepsin B/kreatinin	pro-katepsin B v moči adjustovaný na kreatinin

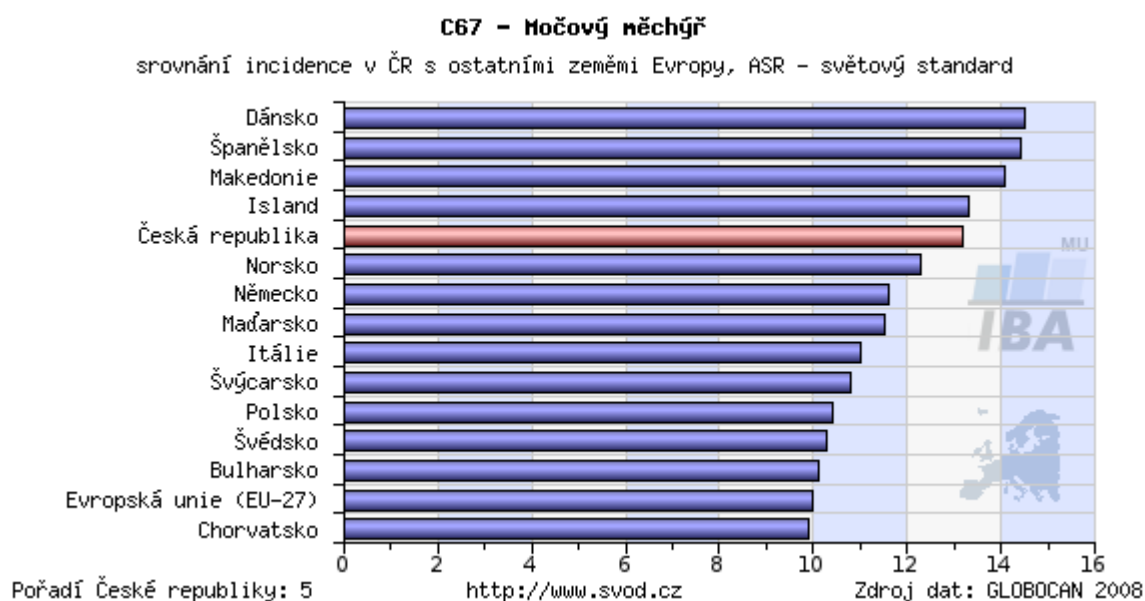
OBSAH

1	Úvod do problematiky karcinomu močového měchýře	7
1.1	Epidemiologie	7
1.2	Etiologie	10
1.3	Histologie	10
1.4	Stadia onemocnění	12
1.5	Cytologie nádorové markery karcinomu močového měchýře	14
1.6	Léčba	17
2	Lysosomální proteázy	20
2.1	Cysteinové proteázy	21
2.2	Katepsiny	21
2.3	Katepsin B	21
3	Aktivita katepsinu B u pacientů s karcinomem močového měchýře	24
3.1	Hypotézy a cíle práce	24
3.2	Materiál a metodika	25
3.3	Statistická analýza a výpočty	31
3.4	Výsledky	47
3.5	Diskuze	57
3.6	Závěr	59
3.7	Citovaná literatura	60
3.8	Souhrn	64
4	Publikace výsledků se vztahem k tématu dizertace	65
5	Abstrakta se vztahem k tématu dizertace	66
6	Dedikace grantu	66
7	Poděkování	67

1 Úvod do problematiky karcinomu močového měchýře

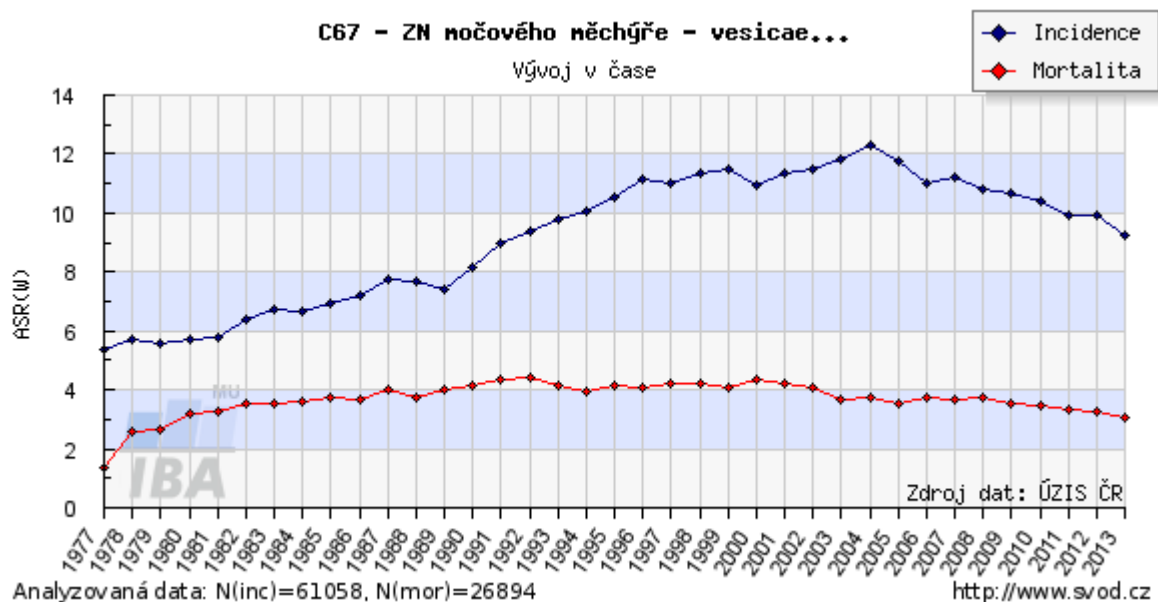
1.1 Epidemiologie

Karcinom močového měchýře je nejčastějším zhoubným nádorem urogenitálního traktu a obecně sedmým nejčastějším u mužů a 17. u žen. Jeho věkově standardizovaná incidence v EU je 27/100 000 mužů a 6/100 000 žen. Věkem standardizovaná mortalita v EU je u mužů 8/100 000 a 3/100 000 u žen. Incidence tohoto onemocnění vykazuje rozdíly v jednotlivých evropských zemích, s maximem Dánsku a ve Španělsku. Nejnižší incidence v EU je potom ve Finsku (1).



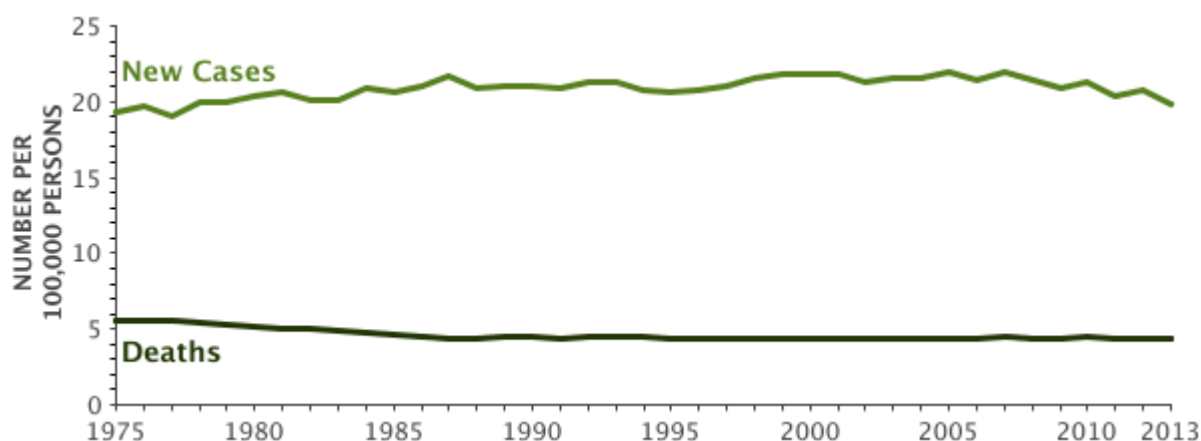
Graf č 1 – Srovnání incidence karcinomu měchýře v Evropě

Česká republika zaujímá v Evropě páté a v EU třetí místo. Věkově standardizovaná incidence v ČR je 31/100 000 mužů a 10/100 000 žen. Věkem standardizovaná mortalita v ČR je u mužů 11,8/100 000 a 4/100 000 u žen (2).



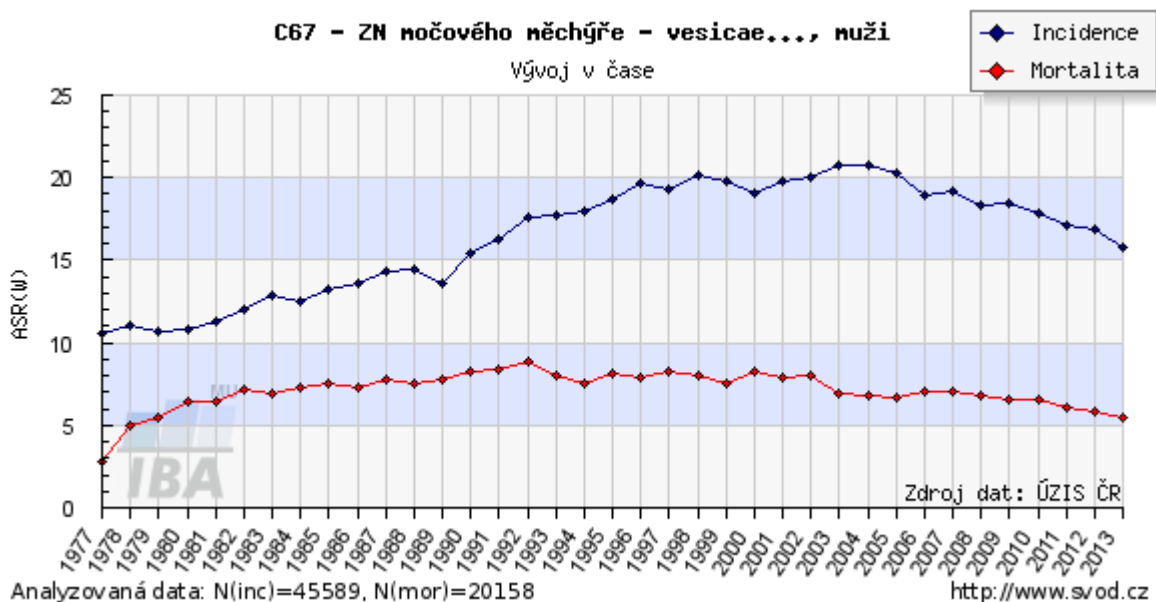
Graf č 2 – Trend incidence a mortality karcinomu měchýře v ČR

Incidence karcinomu močového měchýře ve Spojených státech amerických je 20,1/100 000 mužů a žen (3).

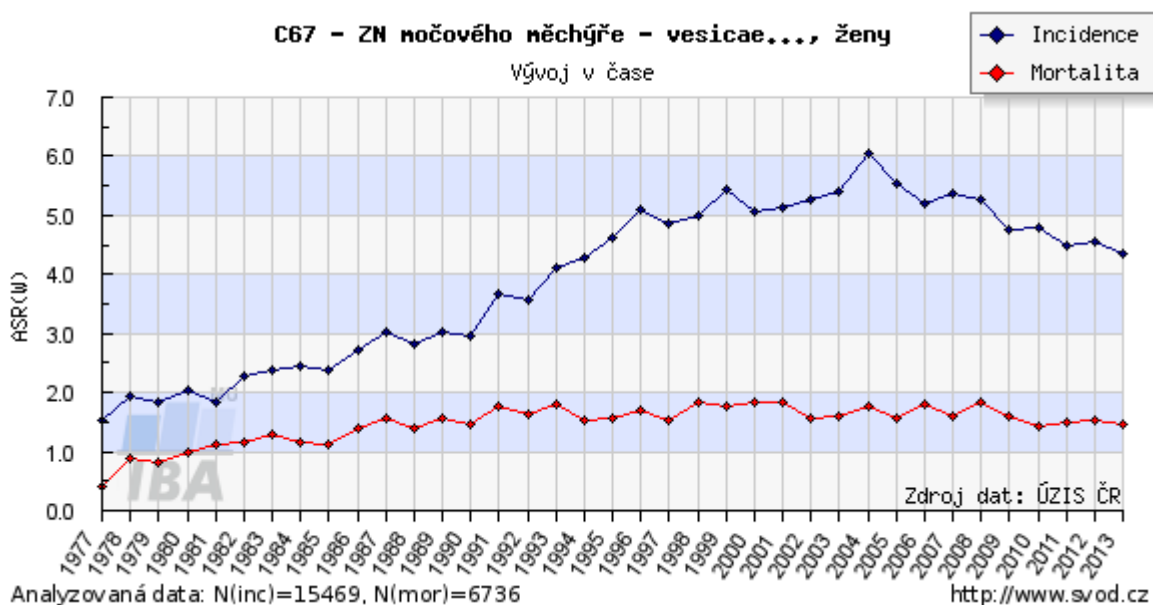


Graf č 3 - Incidence karcinomu močového měchýře v USA

Celosvětově mělo v roce 2012 karcinom močového měchýře 14,1 milionů obyvatel naší planety. Celosvětová věkově standardizovaná incidence karcinomu močového měchýře je 5,3 /100 000 mužů a žen. Při srovnání incidence tohoto nádoru ve „více rozvinutých a méně rozvinutých“ zemích světa je patrný velký rozdíl (9,5/100 000 versus 3,3/100 000). WCRF očekává 24 milionů nemocných s tímto onemocněním v roce 2035 (4). Rozdíl v incidenci onemocnění u nás v závislosti na pohlaví vyjadřují data získaná NOR prezentovaná v následujících dvou grafech (2).



Graf č 4 - Incidence a mortalita karcinomu měchýře v ČR-muži



Graf č 5 – Incidence a mortalita karcinomu měchýře v ČR - ženy

V poslední době lze také pozorovat pokles incidence onemocnění v některých zemích, což je nejspíše odrazem snížení expozice hlavními karcinogeny karcinomu močového měchýře (5).

Přibližně 75% nemocných má v době diagnózy nádor omezený pouze na sliznici močového měchýře – *non-muscle-invasive bladder cancer* – NMIBC (1). Třicet procent pacientů má v době diagnózy zjištěnu invazi nádoru do svaloviny měchýře – *muscle-invasive bladder cancer* – MIBC. Téměř 31% pacientů, kteří podstoupili cystektomii pro invazivní nádor má nádorové postižení regionálních lymfatických uzlin (5,6). Vzdálené metastázy zjišťujeme při stanovení diagnózy onemocnění u 10-15% pacientů (7).

1.2 Etiologie

Etiologicky jsou za hlavní karcinogeny u nádorů močového měchýře považovány kouření a vlivy zevního prostředí (8). Výskyt karcinomu močového měchýře v souvislosti s kořením je udáván přibližně u 50% nemocných. Kouření je považováno za nejzávažnější rizikový faktor u tohoto onemocnění – HR: 2.22;95%CI, 2.03-2.44; pro bývalé kuřáky a HR: 4.1;95% 3.7-4.5 pro kuřáky – (9). Je to dáváno do souvislosti s aromatickými aminy (především α -naftylaminem) a polycyklickými aromatickými uhlovodíky, které jsou obsaženy v cigaretovém kouři.

1.3 Histologie

Histologicky se jedná u více jak 90% nemocných o uroteliální karcinom – TCC – (10). Spinocelulární karcinom představuje 2,7% nádorů močového měchýře, s výjimkou zemí s endemickým výskytem bilharziózy, kde je zastoupen v histologickém nálezu u 59% nemocných s nádorem močového měchýře (11,12). Adenokarcinom se v měchýři vyskytuje zřídka. Je nálezem u 1,4% pacientů, kteří podstoupili cystektomii (13). Asi 10% všech adenokarcinomů měchýře představuje karcinom urachu (14). Mezi vzácně se vyskytující nádory močového měchýře patří malobuněčný karcinom (15).

V současné době je pro určení stadia onemocnění platná 7. verze TNM klasifikace z roku 2009 (16). V praxi je u nejčastější histologické varianty karcinomu močového měchýře (TCC) stále používán velmi zažitý třístupňový, tzv. WHO, grading malignity navržený v roce 1974 (17). Od roku 2004 je doporučeno používání nového rozlišení uroteliálních karcinomů - vyjadřující lépe prognostické riziko - na low grade a high karcinomy (18, 19). Nejčastějším příznakem nádorů močového měchýře je hematurie. Kromě toho mohou být přítomny iritační příznaky v rámci LUTS. Diagnóza je stanovena na základě histologického vyšetření vzorku nádorové tkáně získaného v průběhu endoskopického vyšetření močového měchýře v rámci **transuretrální resekce nádoru (TURB)**. TURB umožňuje (20):

- získat reprezentativní histologický materiál k histologické diagnóze nádoru měchýře
- stanovit hloubku nádorové invaze
- stanovit všechny významné prognostické faktory – grading malignity, počet a velikost nádorů, přítomnost sekundárního Tis
- dosáhnout úplné eradikace exofytických NMIBC

U nemocných s high grade NMIBC a s MIBC je nezbytné doplnit některá další vyšetření k přesnému určení stadiu onemocnění. Vedle – u každého nemocného s maligním nádorovým onemocněním – obligatorního rentgenového snímku hrudníku je indikováno CT vyšetření břicha a malé pánve. Kombinací CT a IVU (CT – urografie) můžeme získat důležité informace o horních cestách močových. Incidence uroteliálních karcinomů je

1,8%, ale při lokalizaci nádoru v měchýři v oblasti jeho trigona dosahuje až 7,5% (21,22,23). Mezi fakultativně prováděná vyšetření patří kostní scintigrafie.

1.4 Stadia onemocnění

Stadia onemocnění karcinomem močového měchýře jsou založena na TNM klasifikaci v platném znění – 7. verze – jsou uvedeny v tabulkách č. 1 a 2(24)

Tabulka 1 - TNM klasifikace nádorů močového

T0	Primární nádor není přítomen
Ta	Neinvazivní papilární karcinom
Tis	Karcinom in situ („plochý nádor“)
T2	Nádor postihuje svalovinu
T2a	Nádor postihuje povrchovou svalovinu (vnitřní polovinu)
T2b	Nádor postihuje hlubokou svalovinu (zevní polovinu)
T3	Nádor postihuje perivezikální tkáň
T3a	Mikroskopicky
T3b	Makroskopicky (extravezikální masy)
T4	Nádor postihuje: stroma prostaty/semenné vázky/dělohu/pochvu/ stěnu pánevní/stěnu břišní
T4a	Nádor postihuje: stroma prostaty/semenné vázky/dělohu/pochvu
T4b	Nádor postihuje: stěnu pánevní/stěnu břišní
N0	Regionální uzliny bez metastáz
N1	Metastáza v jedné mízní uzlině malé pánve – hypogastrické/ obturatorní/zevní ilické/presakrální
N2	Metastáza ve vícečetných uzlinách malé pánve – hypogastrické/ obturatorní/zevní ilické/presakrální
N3	Metastáza ve společné ilické uzlině
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy

Tabulka 2 - Stadia nádorů močového měchýře

Stadium 0a	Ta	N0	M0
Stadium 0is	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2a, T2b	N0	M0
Stadium III	T3a, T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Stadium IV	T4b	N0	M0
	Jakékoli T	N1, N2, N3	M0
	Jakékoli T	Jakékoli T	M1

1.5 Cytologie a nádorové markery

Velmi cenným vyšetřením, jak v diagnostice nádoru měchýře tak i při další sledování pacientů s NIMBC, je cytologie. **Cytologické vyšetření buněk** ve vymočené moči nebo buněk získaných výplachem močového měchýře má vysokou senzitivitu při nálezů high grade karcinomu, ale nízkou v případě, že je v měchýři přítomen low grade karcinom (25). Lotan a Roehborn (26) na základě meta-analýzy dat z osmnácti studií s 1255 pacienty s karcinomem močového měchýře konstatovali 34% senzitivitu a 99% specifitu této metody. Nevýhodou metody jsou rozdíly v její kvalitě mezi jednotlivými pracovišti, které vycházejí ze subjektivní složky hodnocení nálezů, a tím i její horší reprodukovatelnosti (27). I tato skutečnost vedla ke snaze najít spolehlivé nádorové markery karcinomu močového měchýře.

Nádorové markery karcinomu močového měchýře

Žádný z těchto markerů zatím nebyl doporučen k standardní diagnostice nebo sledování pacientů s karcinomem močového měchýře. Ty nejslibnější z nich podle EAU guidelines jsou uvedeny v tabulce č. 3 (28).

Tabulka 3 - Markery močového měchýře

Markers	Overall sensitivity (%)	Overall specificity (%)	Senzitivity for high-grade tumors (%)	Point-of-care test	Level of evidence (LE)
UroVysion	30-86	63-95	66-70	No	3
Microsatellite analysis	58-92	73-100	90-92	No	1b
Immunocyt/uCyt+	52-100	63-75	62-92	No	3
Nuclear matrix protein 22	47-100	55-98	75-83	Yes	3
BTA stat	29-83	56-86	62-75	Yes	3
BTA trak	53-91	28-83	74-77	No	3
Cytokeratins	12-88	73-95	33-100	No	3

Ideální biomarker pro karcinom močového měchýře s dostatečnou negativní prediktivní hodnotou by měl pacientům zajistit vyhnout se invazivnímu vyšetření jako je cystoskopie nebo stratifikovat pacienty podle rizika agresivity onemocnění. V současné době marker s těmito charakteristikami ale není k dispozici. Testy schválené a doporučené k použití dle FDA jsou uvedeny v tabulce č. 4(29).

Tabulka 4 – Markery nádorů močového měchýře schválené FDA			
Test	Senzitivita	Specificita	Komentář
	(%)	(%)	
Cytologie	25-92	86-97	↑specificita, ↓sensitivita (hlavně pro LG nádory)
High grade	80-90	98-100	„interobserver variation“
Low grade	4-31	6-100	
Immunocyt	81-90	61-78	↑sensitivita (i pro LG), použití s cytologií, „interobserver variation“
BTA stat	53-83	67-72	„rapid point of care, ↑false positive rate“
BTA TRAK	66-72	51-75	specializovaná laboratoř, „↑false positive rate“
Bladder Check/NMP22	51-85	77-96	↑specificita a sensitivita,
Urovysion/FISH	69-75	82-89	Může identifikovat časné nádorové změny, specializovaná laboratoř
BTA=bladder tumor antigen	NMP= nuclear matrix protein	FISH=fluorescence in situ hybridisation	

BTA-stat, BTA TRAK, NMP22 a UroVysion jsou doporučeny pro dignostiku karcinomu a sledování pacientů. ImmunoCyt je vhodný jen pro sledování (29).

ImmunoCyt test je založen na průkazu tří fluorescenčních protilátek reagujících s antigeny M344, LDQ10 a 19A211 nádorových buněk v moči (30).

Pro karcinom močového měchýře jsou používány dvě formy BTA testu (Polymedco Inc., Cortlandt Manor, NY, USA), které jsou schopné detekovat humání faktor komplementu H-related proteinu (cFH). BTA stat test stanovený „point-of-care“ imunoanalýzou má kvalitativní charakter - sensitivita 53-83%, specificita 67-72%. BTA TRAK se stanovuje metodou ELISA a má charakter kvantitativního testu - sensitivita 66-72%, specificita 51-75% (31,32).

NMP22 (BladderCheck) je imunologický test pro detekci jaderné matrix protein 22 v moči. Je to marker buněčné smrti urotelu. Jeho elevaci v moči je možné pozorovat u pacientů s karcinomem močového měchýře. Pro diagnostiku karcinomu měchýře je u NMP22 cut-off koncentrace 10 u/mL. Spíše než detekci specifického nádorového antigenu močového NMP22 testy měří celularitu nebo úroveň obratu buněk v močovém měchýři. Jeho význam snižují možné falešně pozitivní výsledky při zánětu nebo hematurii z jiných příčin než je přítomnost karcinomu. Senzitivita NMP22 je 51-85% a specificita 77-96%. Pacienti s pozitivním NMP22 při negativním cystoskopickém nálezů mají téměř desetkrát vyšší riziko recidivy nádoru v prvním roce sledování ve srovnání s pacienty s negativním výsledkem testu (33, 34). Hwang (35) zaznamenal vyšší senzitivitu testu NMP22 u low-grade nádorů než u cytologie.

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Tento test je také označován jako UroVysion (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). Jedná se molekulárně genetickou techniku používanou pro detekci aneuploidie chromozomů 3, 7 a 17, a také pro ztrátu lokusu 9p21 v uroteliálních buňkách (36). Test by mohl odlišit zánětlivé a reaktivní změny od recidivy nádoru při podezřelém cystoskopickém a cytologickém nálezů u pacientů, kteří byli nedávno léčeni imunoterapií BCG vakcínou (37, 38). Zdá se, že má vysokou specificitu pro detekci karcinomu močového měchýře a schopnost detekovat recidivu nádoru před její klinickou manifestací (29).

1.5 Léčba

Základem léčby NMIBC je kompletní odstranění nádorové léze v měchýři transuretrální resekci (TURB). Při neúplné resekci nebo histologickém potvrzení HIGH grade karcinomu je indikováno opakování TURB do šesti týdnů od prvního výkonu. Opakování TURB je také indikováno, pokud není přítomna ve vzorcích resekátů nádoru měchýře svalovina detruzoru. Další postup závisí na rozsahu nádoru v měchýři, stupni jeho invaze, gradingu malignity a zařazení pacienta do rizikové skupiny (nízké – střední – vysoké). Zařazení pacientů do příslušné skupiny dle míry rizika recidivy a progresu nádoru je rozhodující pro rozšíření chirurgické léčby o adjuvantní onkologickou léčbu (20). Charakteristiky jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka 5 - Rozdělení do rizikových skupin

Rozdělení do rizikových skupin	Charakteristika
Low - risk	Primární, solitární, Ta, G1(LG), <3cm, ne CIS
Intermediate - risk	Všechny nádory nezařazené do ostatních dvou skupin
High - risk	Některá z uvedených charakteristik: <ul style="list-style-type: none">• T1 nádory• G3 (HG) nádory• CIS• Mnohočetné a recidivující a velké (>3cm) Ta G1 G2 nádory (všechny podmínky musí být uvedeny v tomto bodě)

EAU guidelines (20) u pacientů zařazených do skupiny s nízkým rizikem doporučuje jednorázovou bezprostřední (do šesti hodin od TURB) pooperační instilaci cytostatika („single shot“) do močového měchýře. Z cytostatik jsou v této indikaci doporučovány:

- Mitomycin C v dávce 40mg/30-50ml fyziologického roztoku/60 minut
- Epirubicin v dávce 50mg/30-50ml fyziologického roztoku/60 minut

Mezi kontraindikace této chemoterapie patří kromě alergie na uvedené látky perforace močového měchýře v průběhu TURB nebo výrazná pooperační hematurie. U pacientů se středním nebo vysokým rizikem recidivy a středním rizikem progresu se doporučuje - kromě jedné pooperační instilace chemoterapeutika - intravezikální imunoterapie s aplikací BCG (bacillus Calmette-Guérin) po dobu minimálně jednoho roku nebo pokračování intravezikální chemoterapie. Pacienti s papilárními tumory s vysokým rizikem progresu a CIS by měli podstoupit intravezikální BCG terapii trvající po dobu jednoho roku.

Pacientům s nejvyšším rizikem je vhodné nabídnout cystektomii. Tato modalita by měla být doporučena i pacientům, u nichž došlo k recidivě nádoru po léčbě BCG vakcínou (20).

Základem léčby MIBC je ve většině západních zemí radikální chirurgická léčba – radikální cystektomie (39). **Cystektomie (CE)** u muže představuje odstranění močového měchýře s prostatou a semennými vajíčky spolu s distální částí močovodů. U ženy kromě měchýře odstraňujeme i dělohu a přední část pochvy. V současné době je doporučována i extenzivní pánevní lymfadenektomie. Problematika neadjuvantní systémové chemoterapie není v současné době jednoznačně vyřešena. Některá data sice ukazují na zlepšení celkového pětiletého přežití o 5-8% při podání **neadjuvantní systémové chemoterapie** režimy založenými na cisplatině, ale v současné době je doporučována pouze fakultativně (39). Součástí CE je samozřejmě kromě odstranění močového měchýře derivace moče. V současnosti jsou při CE používány tyto techniky **derivace moči**:

- Inkontinentní
 - Ureteroileostomie (UIS)
 - Ureterostomie
- Kontinentní
 - Ortotopické náhrady močového měchýře
 - Heterotopické náhrady s kontinentní kutánní stomií
 - Kontinentní derivace moči s využitím análního svěrače

Recentně je u poloviny pacientů při CE vytvářena ortotopická náhrada a u třetiny ureteroileostomie. Pro svou jednoduchost je UIS vhodná především u starších nebo polymorbidních nemocných. Pro nemocného musí být vybrána ta nejvhodnější konkrétní derivace „na míru“ (40). Z uvedeného je zřejmé, že se jedná pro pacienta o náročný operační výkon. Před jeho provedením je, kromě rozsahu vlastního nádorového onemocnění, nezbytné posouzení „status performance“ u nemocného, jeho komorbidit, interního stavu s důrazem na stav kardiovaskulárního aparátu a funkční kapacity plic. Kromě standardních hodnotících škál ECOG a ASA existuje celá řada dalších metod k zhodnocení rizika cystektomie pro konkrétního nemocného. Pouze CCI (Charlson Comorbidity Index) ve verzi vtažené k věku pacienta koreluje s karcinomem specifickou mortalitou i mortalitou z jiných příčin (41).

Pětileté **přežití** bez známek onemocnění je při použití jen chirurgické léčby 76% u pacientů s nádorem pT1, 74% při pT2, 52% pro pT3, a 36% při nálezů pT4. Ovšem v případě postižení pánevních uzlin je menší než 34-43% (42). Desetileté karcinom specifické přežití je výrazně lepší než celkové přežití. Pro nádory definované jako pT < 3a je 72,9%, respektive 49,1% a 33,3%, respektive 22,8% pro pT >3a (43).

Podle aktuálních doporučení EAU guidelines (39) není obecné doporučení k indikaci **adjuvantní chemoterapie** mimo její podání v rámci klinické studie. Měla by být nabídnuta pacientům s postižením mízních uzlin (N+) v případě, že neměli neoadjuvantní

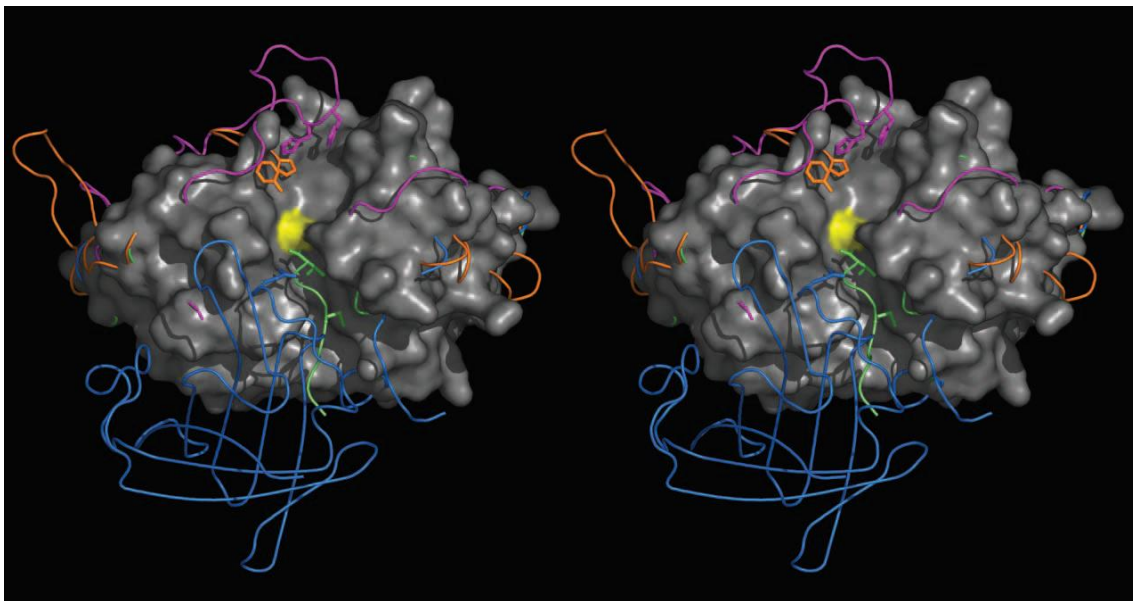
chemoterapii. Podle mých zkušeností při pozitivním nálezu uzlinových metastáz po CE s neadjuvantní chemoterapií, by mělo být zváženo po operaci další pokračování chemoterapie. V závislosti na rozsahu odpovědi k neadjuvantní chemoterapii použijeme k následné léčbě buď stejnou anebo odlišnou kombinaci cytostatik.

U pacientů, kteří buď neakceptují CE anebo ji nemohou podstoupit z důvodů závažných komorbidit, lze za určitých podmínek použít „*měchýř šetřící*“ *postupy*. V nich je spíše doporučován multimodální postup než v předchozí době jen používaná radioterapie. V praxi to představuje mezioborovou spolupráci urologa s radiačním a klinickým onkologem. V rámci této kooperace je, po TURB, pokračováno radioterapií s konkomitantní chemoterapií. Jak CE, tak i měchýř šetřící postupy udávají srovnatelné pětileté přežití 50-60%. Nicméně nejsou spolehlivá porovnávací data z randomizovaných studií. Navíc publikované soubory pacientů léčených měchýř šetřícími postupy bývají vysoce selektované s ohledem na rozsah onemocnění, což také brání odpovídajícímu srovnání(44, 45). Přesto jsou tyto postupy velmi dobrou léčebnou alternativou pro část pacientů s do svaloviny invazivním karcinomem močového měchýře. Použitá dávka při radioterapii se zde pohybuje v rozmezí 60-66Gy. Konkomitantní chemoterapie využívá režimy jejímž základem je, stejně jako v ostatních indikacích u karcinomu močového měchýře, cisplatina.

Léčba generalizovaného onemocnění je pouze paliativní. Jejím základem je zpravidla kombinovaná chemoterapie. Chemoterapie MVAC - metotrexát + vinblastin + cisplatina + doxorubicin – byla řadu let neúčinnějším režimem pro uroteliální karcinom s RR 46%. Její velkou nevýhodou je vysoká - zejména hematologická - toxicita s 19% četností febrilních neutropenií. Kombinace gemcitabinu s cisplatinou má podobnou účinnost (RR 49%) při výrazně nižší toxicitě. V první linii léčby jsou nejčastěji používány právě tyto dva chemoterapeutické režimy Z dalších režimů, jejíž součástí je cisplatina je někdy využívána u TCC trojkombinace – gemcitabin + paklitaxel + cisplatina - a v poslední době některými pracovišti u pacientů ve velmi dobrém stavu akcelerovaná varianta režimu MVAC (MVAC-HD) s podporou hematopoetickými růstovými faktory (G-CSF). V chemoterapii kde není možné použití cisplatinu anebo v případě nepřítomnosti odpovědi na léčbu cisplatinou se uplatňují dvojkombinace gemcitabinu s paklitaxelem a režimy s oxaliplatinou (46,47,48,49).

2 Lysosomální proteázy

Proteolytické enzymy, označované jako proteázy nebo peptidázy, mají zásadní význam v mnoha důležitých biologických procesech živých organismů. V současné době je známo více jak padesát lysosomálních enzymů. Cysteinové proteázy představují jeden z pěti typů proteáz. Nejvíce z nich jsou prostudovány papain-proteázy zahrnující i „rodinu“ katepsinových proteáz. Lysosomální proteázy mají za fyziologických podmínek důležitou úlohu metabolismu proteinů. Kromě jiného se podílejí na degradaci extracelulární matrix a účastní se i procesu apoptozy(50).



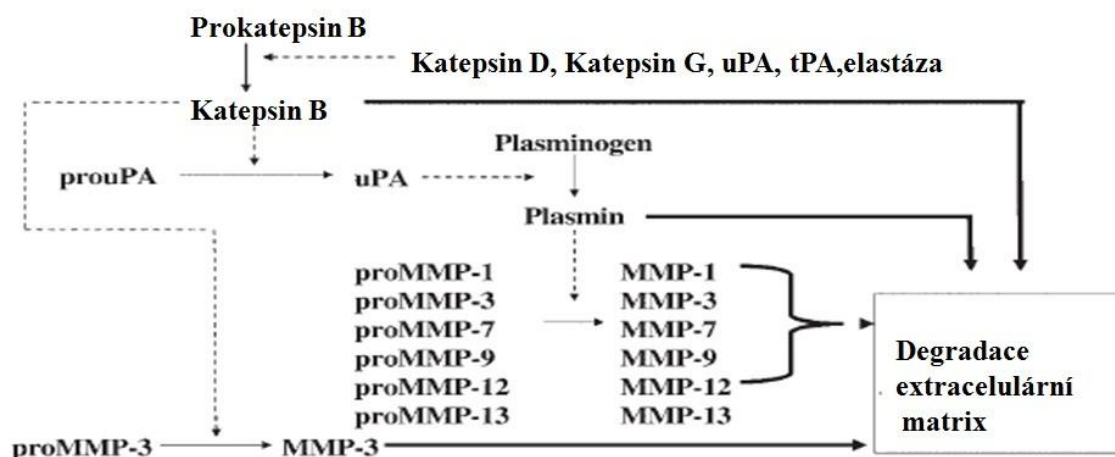
Obrázek 1 - Strukturální charakteristiky katepsinů (H,C,B a X): zdroj PyMol (56)

2.1 Katepsiny

Katepsiny jsou lysosomální enzymy mající klíčové místo intracelulárním metabolismu proteinů. Nejrozsáhlejší skupinu lysosomálních enzymů tvoří cysteinové proteázy, charakterizované přítomností cysteinu v aktivním centru molekuly a stabilitou v rozmezí pH 4,0 – 7,0. Do této skupiny cysteinových proteáz patří katepsiny B, L, H, S, M a T.

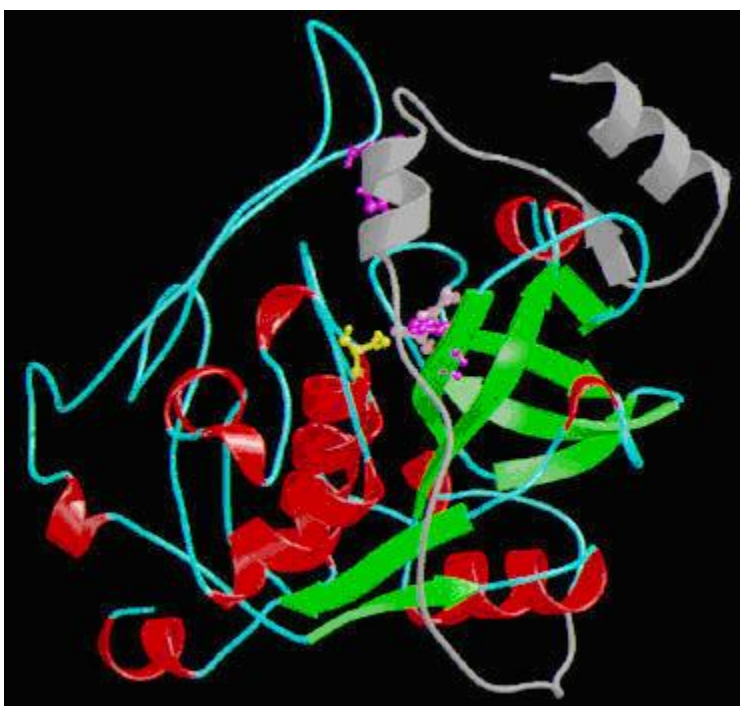
2.2 Katepsin B

Katepsin B (KB) je thiol – dependentní proteáza nalézající se za normálních okolností v lysosomech savčích buněk. Ve tkáni je přítomen buď jen s jednoduchým řetězcem nebo s jednoduchým a dvojitým řetězcem (těžký řetězec s MV 29kDa, lehký řetězec s MV 6kDa). Je syntetizován nejprve jako inaktivní prekurzor – pro-katepsin B – o vysoké molekulové váze (46kDa). Ten vzniká MPR aktivací z prepro-katepsinu, který se nachází v endoplazmatickém retikulu. Pro-katepsin je v lysosomech aktivován (glykosylace) proteázami na katepsin B – glykoprotein (33kDa), který je tvořen 230-250 aminokyselinami (51). Schéma syntézy a metabolismu katepsinu B je znázorněn na obrázku na obrázku č. 2 a jeho struktura na obrázku č. 3.



Yan a Sloane, 2003

Obrázek 2: syntéza a metabolismus katepsinu B (51)



Obrázek 3: Richardsonův diagram struktury pro-katepsinu B (56)

Tvorbu katepsinu B řídí gen 8p22 skládající se ze 12 exonů (52, 53). Tento gen je exprimován u řady nádorových onemocnění, kde je patrně zodpovědný za jejich progresi (51, 54). Katepsin B mRNA se může vyskytovat v různých variantách produkovaných alternativními exony. Ztráta exonu 2 nebo 3 u katepsin B mRNA je spojována s některými zhoubnými nádory (52,53,54).

Katepsin B se v lysozomech podílí na degradaci proteinů a má různé funkce v udržení metabolismu buněk za fyziologických stavů. Výskyt katepsinu B anebo jeho proteinů a jejich vysoká aktivita je popsána u celé řady nádorových onemocnění. Mezi ně patří karcinom prosu, děložního čípku, vaječníků, tlustého střeva, žaludku, plic, štítné žlázy a gliom. *O jeho významu u urologických nádorů bylo dosud jen velmi málo zpráv.* V popředí zájmu je katepsin B tedy nejen pro své fyziologické místo v metabolismu proteinů, ale také proto, že je mu přisuzována významná úloha v řadě patologických procesů, včetně nádorového bujení. Z neoncologických onemocnění byla jeho úloha studována zejména u pacientů s Alzheimerovou chorobou. V této souvislosti byla zjištěna vysoká aktivita cysteinových proteáz - zejména katepsinu B - podílejících se na patologické tvorbě toxických β -amyloidových peptidů, jejichž akumulace je pozorována u této choroby (55).

Účastní se především přerozdělování látek na povrchu buněk, včetně degradace extracelulární matrix (ECM). Na ní se katepsin B podílí buď přímo proteolytickou degradací anebo nepřímo aktivací a zesílením účinků ECM degradujících proteáz. Hraje

důležitou roli v přímé extracelulární a intracelulární remodelaci extracelulární matrix. Na tomto procesu se podílí tím, že je schopen degradovat proteiny extracelulární matrix - laminin, fibronectin a kolagen IV. Kromě toho katepsin B aktivovat přeměnu plasminogenu v plasmin, který se podílí na degradaci rozličných součástí extracelulární matrix, jako jsou intersticiální kolagenáza, stromelysin-1, gelatináza B, metaloelastáza a kolagenáza-3. Dále může měnit rovnováhu mezi metaloproteinázami (MMP) a jejich inhibitory. Aktivuje přímo některé MMP, jako jsou intersticiální prokolagenáza (proMMPs-3) a prostromelysin-1 (proMMPs-2). Štěpí a inaktivuje také některé MMP-inhibitory (TIMP-1 a TIMP-2). Těmito mechanismy katepsin B podporuje oddělování nádorových buněk od extracelulární matrix a podílí se na jejich migraci a metastazování. Navíc, během proteolytického odbourávání ECM, uvolňuje některé na ECM vázané růstové faktory, jako bFGF, EGF, TGF- β , IGF-i a VEGF. „Osvobozením“ se tyto růstové faktory stávají biologicky dostupnými a mohou se dále podílet na modelaci receptorů buněk nádoru a stromatu (51,52).

3 Aktivita katepsinu B u pacientů s karcinomem močového měchýře

3.1 Cíl projektu a pracovní hypotéza

V poslední době byla testována celá řada látek jako možné nádorové markery (zejména v moči) pro karcinom močového měchýře. Žádná z nich však zatím není přínosem pro standardní diagnostickou nebo „follow-up“ péči o pacienty s karcinomem močového měchýře, s výjimkou močové cytologie. Prověřením našich vlastních výsledků z předchozí pilotní studie jsme se snažili na souboru našich pacientů s karcinomem močového měchýře stanovit klinický význam katepsinu B.

Stanovili jsme si tyto **hlavní cíle**:

- a) *Porovnat klinickou užitečnost stanovení koncentrace pro-katepsinu B a katepsinu B v séru a moči*
- b) *Zodpovědět otázku, zda by hodnoty některé z těchto koncentrací v tělních tekutinách mohly přispět k dřívějšímu stanovení diagnózy karcinomu močového měchýře?*
- c) *Je možné využít katepsin B nebo pro-katepsin B jako prognostický faktor u pacientů s karcinomem močového měchýře?*

Jako **vedlejší cíle** projektu jsme chtěli odpovědět na další otázky:

- d) *Je vhodný katepsin B nebo pro-katepsin B k neinvazivnímu monitorování léčby?*
- e) *Umožnilo by využití katepsinu B, respektive pro-katepsinu B v klinické praxi snížit frekvenci nezbytného a pro pacienty velmi nepříjemného cystoskopického vyšetření?*

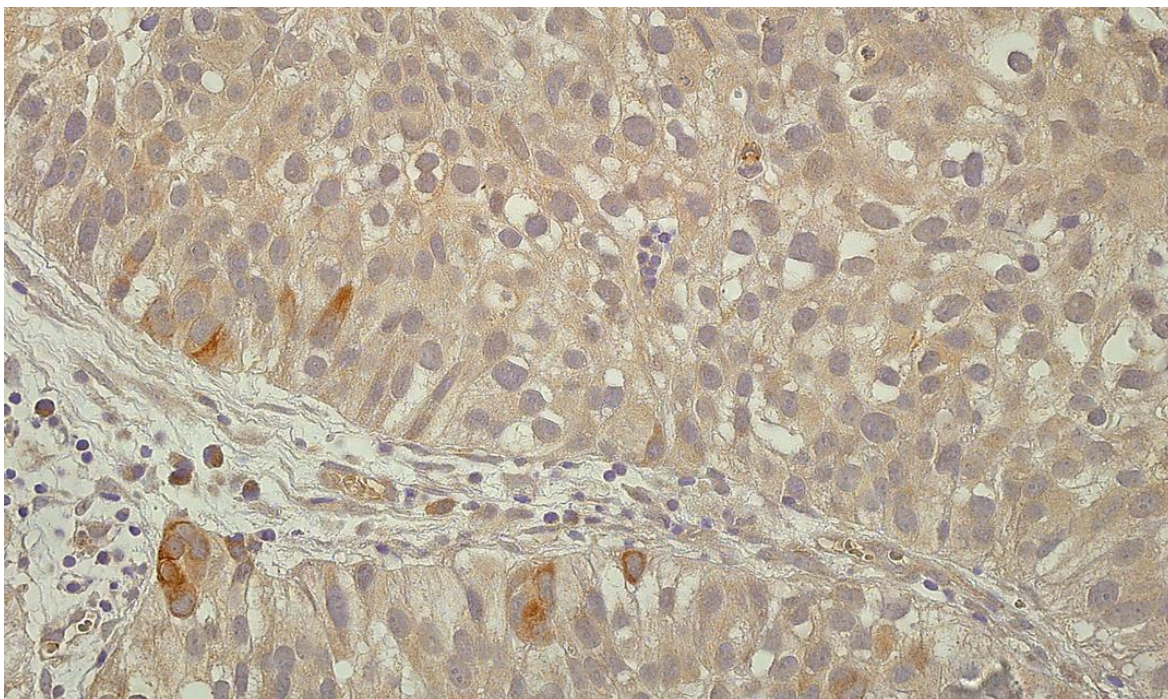
3.2 Metody

Aktivitu KB u pacientů s karcinomem močového měchýře jsme zjišťovali stanovením jeho exprese v nádorové tkáni a stanovením jeho koncentrace v jejich séru moči. Vlastní diagnóza nádorového onemocnění byla určena standardním způsobem – cystoskopie, zobrazovací metody (CT, NMR). Histologická diagnóza karcinomu močového měchýře byla vždy potvrzena standardním histologickým vyšetřením nádorové tkáně získané buď transuretrální resekci močového měchýře nebo cystektomií.

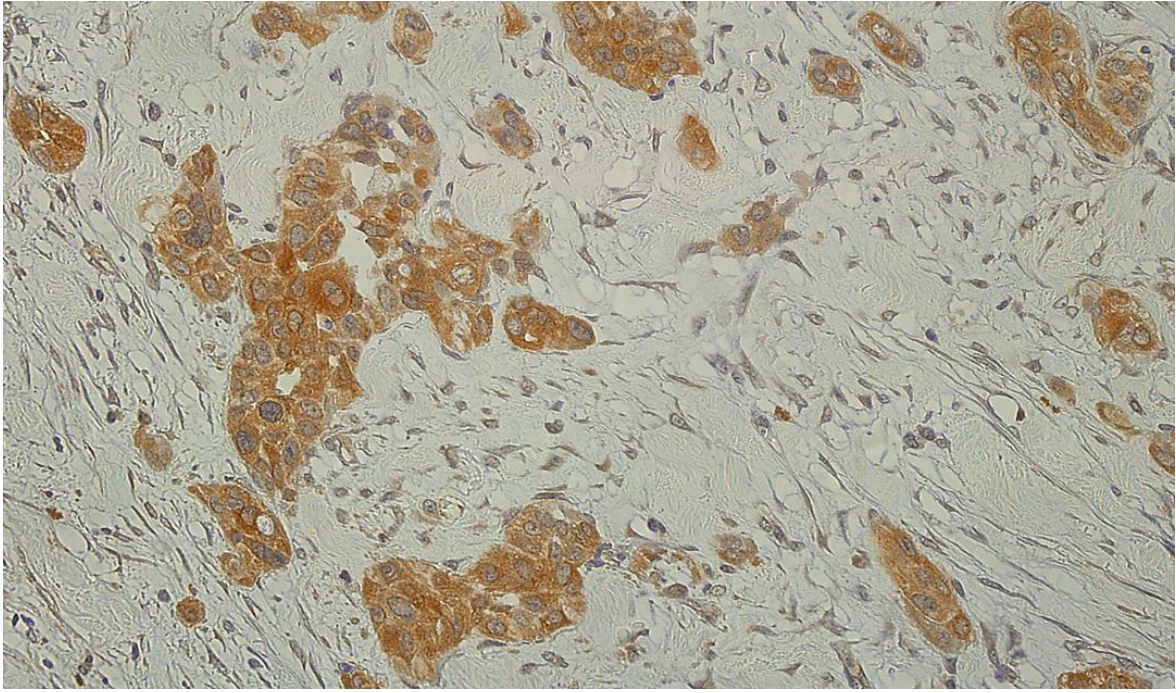
Stanovení exprese katepsinu B v nádorové tkáni.

Vyšetření exprese katepsinu B u nemocných s karcinomem močového měchýře jsme prováděli pomocí imunohistochemického vyšetření tkání fixovaných ve formolu a zalitých do parafínu. Po klasickém zpracování tkáně (fixace přikrojené tkáně v pufovaném roztoku 4% formaldehydu, standardní histologické zpracování tkáně do podoby parafinového bloku) a následném pečlivém zhodnocení bioptického materiálu v přehledném barvení hematoxylinem a eozinem jsme vybrali parafinový blok s reprezentativní nádorovou populací vhodnou pro imunohistochemické stanovení exprese katepsinu B. Na rotačním mikrotomu jsme nakrájeli z parafinového bloku histologické řezy silné 1-2 mikrometry. Po usušení, deparafinaci a zavodnění histologických řezů jsme v tkáni blokovali zbytkovou aktivitu endogenní peroxidázy roztokem 3% peroxidu vodíku. Následně jsme na promyté histologické řezy aplikovali směs dvou myších monoklonálních protilátek (klony CB131, výrobce Novocastra a AbD Serotec, ředění 1:40) specificky reagujících s katepsinem B. Reakce antigenu s protilátkou nevyžadovala revitalizaci antigenního epitopu. Po inkubaci se směsí primárních protilátek a po promytí preparátů jsme detekovali vazbu primární protilátky na epitop antigenu pomocí sekundární polyklonální protilátky značené biotinem. Po inkubaci se sekundární protilátkou a po promytí preparátů jsme aplikovali křenovou peroxidázu značenou streptavidinem. Vazbou avidin – biotin došlo k navázání peroxidázy na sekundární protilátku. Následně jsme na tkáně aplikovali směs substrátu pro peroxidázu (peroxid vodíku) a kosubstrátu (3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid). Po promytí jsme jádra dobarvili roztokem Harrisova hematoxylinu. Po odvodnění tkáně a prosycení xylenem jsme preparáty zamontovali do solakrylu. Hodnocení výsledku imunohistochemického vyšetření (vznik hnědého precipitátu v místě vazby primární protilátky) jsme prováděli ve světelném mikroskopu. Expresi katepsinu B (cytoplasmatickou granulární pozitivitu nádorových buněk - katepsin B – lysozomální proteáza) jsme hodnotili semikvantitativně, a to jak intenzitu výsledného zbarvení (obrázky č. 4,5,6,7) vyjádřenou ve stupních (0, 1+, 2+, 3+), tak i počtem pozitivních nádorových buněk (procentuální vyjádření). Tímto způsobem jsme rozdělili pacienty v našem souboru do dvou skupin: **skupina s katepsin B negativními nádory (0) a skupina s katepsin B pozitivními nádory (+).**

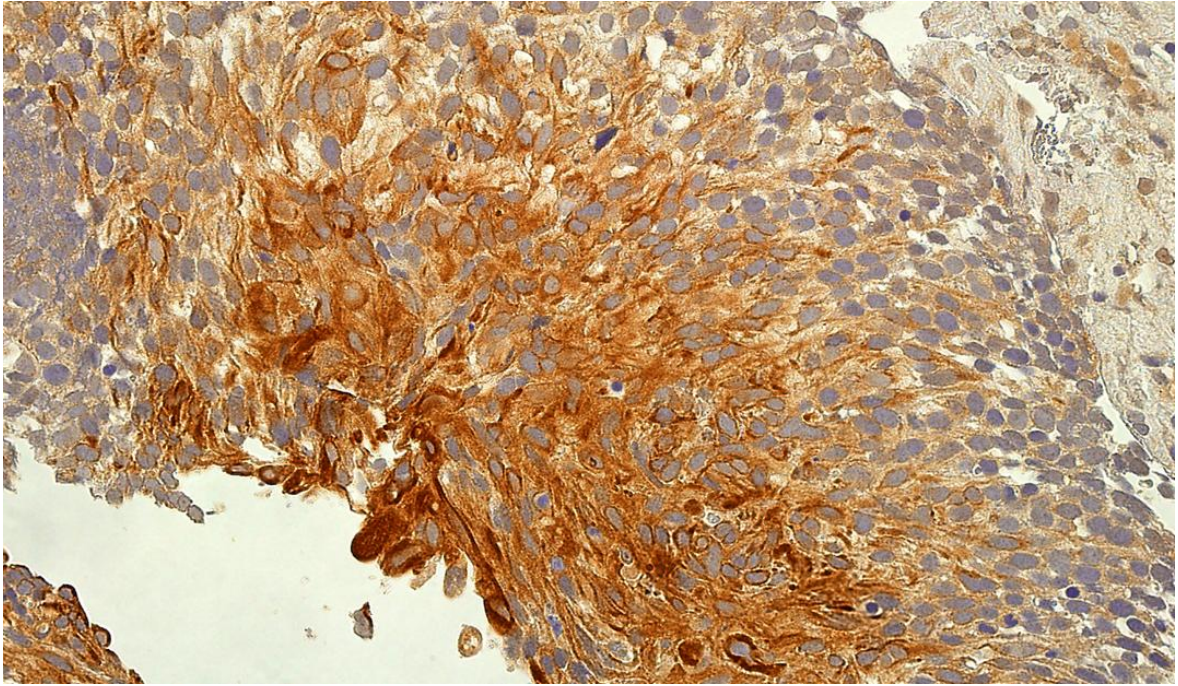
Hodnotili jsme vztah exprese katepsinu B ve tkáni (*katepsin B* pozitivní/*katepsin B* negativní nádory) k gradingu malignity a stagingu nádoru. Při tomto hodnocení jsme použili chi kvadrát test s 5% hladinou významnosti.



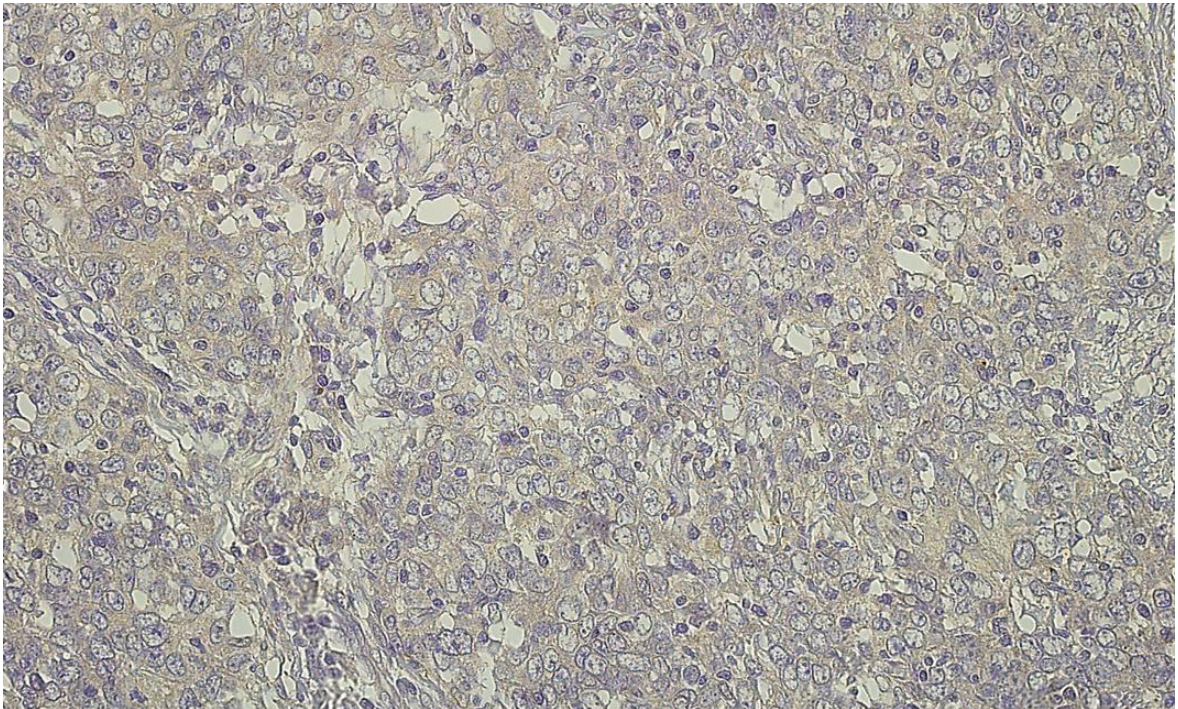
Obrázek 4: katepsin B - hodnocení 1+



Obrázek 5: katepsin B - hodnocení 2+



Obrázek 6: katepsin B - hodnocení 3+



Obrázek 7: katepsin B - hodnocení 0

Stanovení koncentrace katepsinu B a pro-katepsinu B v séru a moči pacientů a kontrolní skupiny zdravých jedinců.

Vzhledem k tomu, že ani v době našeho pilotního projektu, a také ani na začátku pokračování naší studie s podporou grantu nebyla k dispozici dostupná technologie (neexistoval kit) pro určení koncentrace vlastního katepsinu B, stanovovali jsme nejprve aktivitu katepsinu B v séru a moči v prvních letech projektu měřením koncentrace pro-katepsinu B. V roce 2013 byl již dostupný i kit pro vlastní katepsin B, což nám umožnilo nejen stanovení koncentrací obou látek s využitím zmrazených vzorků tělních tekutin pacientů, ale i vzájemné porovnání obou těchto metod.

Vzorky moče a séra odebrané pacientům ráno v den operace byly zmrazeny na -70°C . Stejným způsobem byly ošetřeny a skladovány vzorky moče a séra odebrané zdravým jedincům v kontrolním souboru. Obě skupiny – skupina pacientů s karcinomem močového měchýře bez známek generalizace i kontrolní skupina zdravých jedinců – měly porovnatelné statistické charakteristiky.

Koncentrace katepsinu B i pro-katepsinu B byly potom měřeny ze zmrazených vzorků séra a moči pomocí dvou komerčně dostupných imunologických metod určených pro hodnocení aktivity enzymů *ELISA*, *Quantikine pro-katepsinu B test*, (*RD Biosystems*) a *ELISA katepsin B testu*, (*Cloud-klon Corporation*). Změřené koncentrace katepsinu B i pro-katepsinu B v moči byly adjustovány na hladinu kreatininu, která byla v každém vzorku stanovena enzymatickou kreatinázovou kolorimetrickou metodou na analyzátoru Avia 1800 (Siemens Medical, diagnostica, USA). Koncentrace byly vyjádřeny jako μg pro-katepsin B/mmol kreatininu a μg katepsin B/mmol kreatininu.

Referenční rozmezí pro pro-katepsin B v séru je 27 – 126ng/ml a v moči je do 2,54ng/ml.

Referenční rozmezí pro katepsin B v séru a moči nejsou dosud stanovena.

Vzorky tkáně i tělních tekutin byly odebrány u 150 pacientů s karcinomem močového měchýře. Do hodnocení souboru jsme nakonec nemohli zařadit vzorky od 25 pacientů z důvodu nesplnění vstupních kritérií studie, které vyplynuly z buď z dodatečných vyšetření provedených již v době diagnózy anebo z nemožnosti stanovení exprese katepsinu B v termicky poškozené tkáni.

Soubor analyzovaných pacientů je tedy složen ze 125 pacientů s histologicky prokázaným karcinomem močového měchýře bez známek generalizace v době diagnózy. Průměrný věk souboru byl 66,2 let (21 – 91). V souboru bylo 85 mužů (\bar{O} věk 66,3 let) a 40 žen (\bar{O} věk 65,9 let). Neinvazivní („povrchový“) nádor – **NMIBC** – byl zjištěn u 55 a invazivní – **MIBC** – nádor u 70 pacientů. Low-grade karcinom byl nalezen u 39, a high-grade karcinom u 86 pacientů. Medián sledování celého souboru byl 25 měsíců (3 – 104). Medián sledování pacientů s neinvazivním nádorem byl 35 měsíců (9 – 104). Medián sledování pacientů s invazivním nádorem byl 21,5 měsíců (3 – 81). Medián sledování

pacientů s low-grade karcinomem byl 39 měsíců (9 – 104). Medián sledování pacientů s high-grade karcinomem byl 21,5 měsíců (3 – 83). V kontrolním souboru bylo 93 zdravých jedinců. Tento soubor byl sice poněkud menší než soubor pacientů, ale oba soubory měly takové statistické charakteristiky, které umožnily analýzu dat odpovídajícím způsobem.

3.3 Statistická analýza získaných dat a výpočty

K hodnocení vztahu exprese katepsinu B ve tkáni (*katepsin B pozitivní/katepsin B negativní nádory*) k gradingu malignity a stagingu nádoru jsme použili chi kvadrát test s 5% hladinou významnosti.

K analýze koncentrací katepsinu B a pro-katepsinu B v tělních tekutinách byla použita **ROC analýza** (*Receiver Operating Characteristic curve analysis*) se stanovením **AUC** (*area under the curve*).

Normalita rozložení dat byla testována pomocí D'Agostinova testu. Byl k tomu použit statistický software GraphPad Prism, version 6.0 (San Diego, California) a CB Stat (Kristian Linnet, DK, 1999)

K porovnání výsledků mezi metodami bylo využito Mann-Whitneyova testu na hladině významnosti $p < 0,05$ s použitím statistického software GraphPad Prism, version 6.0 (San Diego, California). Tento test jsme také použili k analýze vztahu mezi katepsin B pozitivními/negativními nádory a koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči.

K analýze závislosti výskytu katepsin B pozitivních/negativních nádorů na invazi nádoru a jeho gradingu malignity jsme použili chí kvadrát test ($p < 0,05$).

V následujících tabulkách č. 6,7,8 a 9 jsou uvedeny výpočty a analýza koncentrací pro-katepsinu B v séru a v moči, respektive i jeho koncentrace v moči adjustovaná na koncentraci kreatininu v moči u NMIBC.

Tabulka 6 - Katepsin B negativní NMIBC

	S-proKB SBT 0	U-proKB SBT 0	Upro KB/krea SBT 0
Minimum	36,86	0,434	0,2605
25% Percentile	37,63	0,743	0,2687
Median	45,76	4,943	0,6951
75% Percentile	151,4	9,476	2,134
Maximum	184,7	9,896	2,48
Mean	78,26	5,054	1,033
Std. Deviation	71,22	4,699	1,04
Std. Error of Mean	35,61	2,349	0,5198

S-proKB SBT0=konzentrace pro-katepsinu B v séru u katepsin B negativních neinvazivních nádorů
U-proKB SBT0=konzentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B negativních neinvazivních nádorů
U-proKB SBT0=konzentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B negativních neinvazivních nádorů adjustovaná na kreatinin

Tabulka 7 - Katepsin B pozitivní NMIBC

	U-proKB SBT +	Upro KB/krea SBT+
Minimum	0,032	0,005128
25% Percentile	1,337	0,1354
Median	2,644	0,3342
75% Percentile	5,345	0,6196
Maximum	27,56	61,77
Mean	4,561	2,064
Std. Deviation	5,715	9,702
Std. Error of Mean	0,8165	1,534
U-proKB SBT+=koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B pozitivních neinvazivních nádorů U-proKB SBT+=koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B pozitivních neinvazivních nádorů adjustovaná na kreatinin		

Tabulka 8 – Analýza: pro-katepsin B v séru u katepsin B +/-0 NMIBC

Table Analyzed	SBT,SBT+
Column D	S-proKB SBT +
vs.	vs,
Column A	S-proKB SBT 0
Mann Whitney test	
P value	0,5392
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,D	83,00 , 1142
Mann-Whitney U	73
S-proKB SBT+ = koncentrace pro-katepsinu B v séru u katepsin B pozitivních nádorů S-proKB SBT0 = koncentrace pro-katepsinu B v séru u katepsin B negativních nádorů	

Tabulka 9 – Analýza: pro-katepsin B v moči u katepsin B +/- NMIBC

Table Analyzed	SBT,SBT+
Column E	U-proKB SBT +
vs.	vs,
Column B	U-proKB SBT 0
Mann Whitney test	
P value	0,7825
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,E	117,0 , 1314
Mann-Whitney U	89
U-proKB SBT+ =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B pozitivních neinvazivních nádorů U-proKB SBT0 =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B negativních neinvazivních nádorů	

V tabulkách č. 10 a 11 jsou zaznamenány výpočty a analýzy koncentrací pro-katepsinu B v séru a v moči, respektive i jeho koncentrace v moči adjustovaná na koncentraci kreatininu v moči u MIBC.

Tabulka 10 - pro-katepsin B v séru a moči u MIBC

Upro KB/krea IBT 0	S-proKB IBT +	U-proKB IBT +	Upro KB/krea IBT+
0,128	19,66	0,77	0,1291
0,2134	57,68	3,234	0,4914
0,5459	79	5,996	1,264
1,325	106	20	1,956
2,427	171,6	122,9	32,35
0,801	83,81	15,46	2,474
0,7126	37,8	23,33	5,145
0,2148	5,007	3,368	0,7756
U-pro-KB IBT0 =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B negativních invazivních nádorů U-pro-KB IBT+ =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B pozitivních invazivních nádorů U-pro-KB/krea IBT0 =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B negativních invazivních nádorů adjustovaná na kreatinin v moči U-pro-KB/krea IBT+ =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B pozitivních invazivních nádorů adjustovaná na kreatinin v moči S-pro-KB IBT+ =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B pozitivních invazivních nádorů			

Tabulka 11 – Analýza: pro-katepsin B v moči u MIBC katepsin +/-0

Table Analyzed	IBT,IBT+	IBT,IBT+
Column E	U-proKB IBT +	Upro KB/krea IBT+
vs.	vs,	vs,
Column B	U-proKB IBT 0	Upro KB/krea IBT 0
Mann Whitney test		
P value	0,2181	0,0575
Exact or approximate P value?	Exact	Exact
P value summary	ns	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed
Sum of ranks in column B,E	266,0 , 1504	218,0 , 1322
Mann-Whitney U	200	152
U-pro-KB IBT+ =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B pozitivních invazivních nádorů U-pro-KB/krea IBT+ =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B pozitivních invazivních nádorů adjustovaná na kreatinin v moči U-pro-KB IBT0 =koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B negativních invazivních nádorů U-pro-KB/krea IBT0 = koncentrace pro-katepsinu B v moči u katepsin B negativních invazivních nádorů adjustovaná na kreatinin v moči		

V následujících třech tabulkách (č. 12, 13, 14) uvádím výpočty a analýzu koncentrací pro-katepsinu B v séru a v moči, respektive i jeho koncentrace v moči adjustovaná na koncentraci kreatininu v moči u MIBC.

Tabulka 12 – Analýza: pro-katepsin B u MIBC

Table Analyzed	SBT/IBT		Table Analyzed	SBT/IBT
Column G	S-proKB IBT 0		Column J	S-proKB IBT +
vs.	vs,		vs.	vs,
Column A	S-proKB SBT 0		Column D	S-proKB SBT +
Mann Whitney test			Mann Whitney test	
P value	0,6052		P value	0,4044
Exact or approximate P value?	Exact		Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns		P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No		Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,G	412,0 , 1299		Sum of ranks in column D,J	27,00 , 109,0
Mann-Whitney U	264		Mann-Whitney U	17

Tabulka 13 - Analýza: pro-katepsin B v moči u NMIBC/MIBC

Table Analyzed	SBT/IBT	Table Analyzed	SBT/IBT
Column H	U-proKB IBT 0	Column K	U-proKB IBT +
vs.	vs,	vs.	vs,
Column B	U-proKBSBT 0	Column E	U-proKB SBT +
Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,238	P value	0,6022
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,H	438,0 , 1453	Sum of ranks in column E,K	28,00 , 92,00
Mann-Whitney U	228	Mann-Whitney U	18

Tabulka 14 - Analýza U-pro-katepsin B/kreatinin u NMIBC/MIBC

Table Analyzed	SBT/IBT	Table Analyzed	SBT/IBT
Column I	Upro KB/krea IBT 0	Column L	Upro KB/krea IBT +
vs.	vs,	vs.	vs,
Column C	Upro KB/kreaSBT 0	Column F	Upro KB/krea SBT +
Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,2229	P value	0,7531
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,I	375,0 , 1003	Sum of ranks in column F,L	35,00 , 85,00
Mann-Whitney U	183	Mann-Whitney U	19

Tabulky č. 15 – 18 zahrnují výpočty a analýzu dat koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči u low grade nádorů.

Tabulka 15 – S-pro-katepsin B pro low grade nádory

	S-proKB LG 0	U-proKB LG 0	Upro KB/krea LG 0	S-proKB LG +
Minimum	39,92	0,434	0,2932	0
25% Percentile	39,92	0,434	0,2932	38,82
Median	51,6	8,216	1,097	52,54
75% Percentile	136	10,77	1,534	77
Maximum	136	10,77	1,534	140,9
Mean	75,85	6,472	0,9746	58,15
Std. Deviation	52,45	5,382	0,6292	27,89
Std. Error of Mean	30,28	3,107	0,3633	5,009

Tabulka 16 - U-pro-katepsin pro low grade nádory

	U-proKB LG +	Upro KB/krea LG +
Minimum	0,144	0,01483
25% Percentile	1,446	0,1258
Median	2,364	0,2831
75% Percentile	4,092	0,573
Maximum	20	2,5
Mean	4,149	0,4766
Std. Deviation	5,255	0,5614
Std. Error of Mean	0,8883	0,1061

Tabulka 17 - Analýza: S/U-pro-katepsin B a low grade nádory

Table Analyzed	LG,LG+	Table Analyzed	LG,LG+
Column D	S-proKB LG +	Column E	U-proKB LG +
vs.	vs,	vs.	vs,
Column A	S-proKB LG 0	Column B	U-proKB LG 0
Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,7309	P value	0,5334
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,D	59,00 , 536,0	Sum of ranks in column B,E	71,00 , 670,0
Mann-Whitney U	40	Mann-Whitney U	40

Tabulka 18 – Analýza: U-pro-katepsin B /kreatinin - LG

Table Analyzed	LG,LG+
Column F	Upro KB/krea LG +
vs.	vs,
Column C	Upro KB/krea LG 0
Mann Whitney test	
P value	0,1397
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,F	71,00 , 425,0
Mann-Whitney U	19

Tabulky č. 19 – 26 zahrnují výpočty a analýzu dat koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči u high grade nádorů

Tabulka 19 - S/U pro-katepsin B u high grade katepsin B negativních nádorů

	S-proKB HG 0	U-proKB HG 0	Upro KB/krea HG 0
Minimum	36,86	1,42	0,128
25% Percentile	45,74	1,568	0,2252
Median	65,12	4,334	0,5178
75% Percentile	98,19	9,548	1,249
Maximum	184,7	26,42	2,48
Mean	79,5	6,971	0,8348
Std. Deviation	45,69	7,406	0,8333
Std. Error of Mean	12,67	2,138	0,2406

Tabulka 20 - S/U pro-katepsin B u high grade katepsin B pozitivních nádorů

	S-proKB HG +	U-proKB HG +	Upro KB/krea HG +
Minimum	19,66	0,032	0,005128
25% Percentile	59,44	2,827	0,4593
Median	79,07	5,276	0,9764
75% Percentile	106,5	18,98	1,835
Maximum	188,7	122,9	61,77
Mean	86,42	13,33	3,212
Std. Deviation	39,02	21,3	9,294
Std. Error of Mean	4,664	2,727	1,253

Tabulka 21 – Analýza: S pro-katepsin B u high grade katepsin B pozitivních/ negativních nádorů

Table Analyzed	HG,HG+		Table Analyzed	HG,HG+
Column D	S-proKB HG +		Column E	U-proKB HG +
vs.	vs,		vs.	vs,
Column A	S-proKB HG 0		Column B	U-proKB HG 0
Mann Whitney test			Mann Whitney test	
P value	0,3435		P value	0,3033
Exact or approximate P value?	Exact		Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns		P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No		Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,D	470,0 , 3016		Sum of ranks in column B,E	374,0 , 2327
Mann-Whitney U	379		Mann-Whitney U	296

Tabulka 22 – Analýza: U pro-katepsin B/kreatinin – HG – katepsin B+/0 nádory

Table Analyzed	HG,HG+	
Column F	Upro KB/krea HG +	
vs.	vs,	
Column C	Upro KB/krea HG 0	
Mann Whitney test		
P value		0,129
Exact or approximate P value?	Exact	
P value summary	ns	
Significantly different? (P < 0.05)	No	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
Sum of ranks in column C,F	315,0 , 1963	
Mann-Whitney U		237

Tabulka 23 - pro-katepsin B u katepsin B negativních nádorů

	S-proKB HG 0	U-proKB HG 0	Upro KB/krea HG 0
Minimum	36,86	1,42	0,128
25% Percentile	45,74	1,57	0,2252
Median	65,12	4,33	0,5178
75% Percentile	98,19	9,55	1,249
Maximum	184,7	26,4	2,48
Mean	79,5	6,97	0,8348
Std. Deviation	45,69	7,41	0,8333
Std. Error of Mean	12,67	2,14	0,2406

Tabulka 24 - pro-katepsin B u katepsin B pozitivních nádorů

	S-proKB HG +	U-proKB HG +	Upro KB/krea HG +
Minimum	19,66	0,03	0,005128
25% Percentile	59,44	2,83	0,4593
Median	79,07	5,28	0,9764
75% Percentile	106,5	19	1,835
Maximum	188,7	123	61,77
Mean	86,42	13,3	3,212
Std. Deviation	39,02	21,3	9,294
Std. Error of Mean	4,664	2,73	1,253

Tabulka 25 – Analýza: pro-katepsin B u HG katepsin B pozitivních/negativních nádorů

Table Analyzed	HG,HG+		Table Analyzed
			HG,HG+
Column D	S-proKB HG +		Column E
vs.	vs,		U-proKB HG +
Column A	S-proKB HG 0		U-proKB HG 0
Mann Whitney test			Mann Whitney test
P value	0,3435		P value
			0,3033
Exact or approximate P value?	Exact		Exact or approximate P value?
			Exact
P value summary	ns		P value summary
			ns
Significantly different? (P < 0.05)	No		Significantly different? (P < 0.05)
			No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed		One- or two-tailed P value?
			Two-tailed
Sum of ranks in column A,D	470,0 , 3016		Sum of ranks in column B,E
			374,0 , 2327
Mann-Whitney U	379		Mann-Whitney U
			296

Tabulka 26 – Analýza: U pro-katepsin B/kreatinin u HG katepsin B+/0 nádorů

Table Analyzed	HG,HG+	
Column F	Upro KB/krea HG +	
vs.	vs,	
Column C	Upro KB/krea HG 0	
Mann Whitney test		
P value	0,129	
Exact or approximate P value?	Exact	
P value summary	ns	
Significantly different? (P < 0.05)	No	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
Sum of ranks in column C,F	315,0 , 1963	
Mann-Whitney U	237	

Analýza koncentrací S-pro-katepsinu B, U-pro-katepsinu B a U-pro-katepsinu B adjustovaná na koncentraci kreatininu v moči v závislosti na gradingu malignity při pozitivě katepsinu B v nádorové tkáni je uvedena v tabulkách B č. 27 - 29

Tabulka 27 Analýza: S-pro-katepsin B

Table Analyzed	LG/HG	Table Analyzed	LG/HG
Column G	S-proKB LG 0	Column J	S-proKB LG +
vs.	vs,	vs.	vs,
Column A	S-proKB HG 0	Column D	S-proKB HG +
Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,8143	P value	0,0002
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	***
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,G	112,0 , 24,00	Sum of ranks in column D,J	4062 , 1090
Mann-Whitney U	18	Mann-Whitney U	593,5

Tabulka 28 - Analýza: U-pro-katepsin B

Table Analyzed	LG/HG	Table Analyzed	LG/HG
Column H	U-proKB LG 0	Column K	U-proKB LG +
vs.	vs,	vs.	vs,
Column B	U-proKB HG 0	Column E	U-proKB HG +
Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	> 0,9999	P value	0,0002
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	***
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,H	96,00 , 24,00	Sum of ranks in column E,K	3442 , 1214
Mann-Whitney U	18	Mann-Whitney U	584

Tabulka 29 – Analýza: U-pro-katepsin B/kreatinin

Table Analyzed	LG/HG	Table Analyzed	LG/HG
Column I	Upro KB/krea LG 0	Column L	Upro KB/krea LG +
vs.	vs,	vs.	vs,
Column C	Upro KB/krea HG 0	Column F	Upro KB/krea HG +
Mann Whitney test		Mann Whitney test	
P value	0,5363	P value	< 0,0001
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns	P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	No	Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,I	91,00 , 29,00	Sum of ranks in column F,L	2739 , 747,0
Mann-Whitney U	13	Mann-Whitney U	341

Analýza dat a posouzení některých možných vztahových souvislostí mezi jednotlivými faktory bylo ovlivněno nízkým zastoupením pacientů s low grade karcinomem v našem souboru. Naším jediným klinickým omezením, které jsme si na začátku projektu stanovili, byla nepřítomnost generalizace onemocnění v době diagnózy. Z tohoto důvodu bylo zastoupení pacientů v našem souboru v závislosti na gradingu malignity karcinomu a invazi nádoru nezávislé na nás.

3.4 Výsledky

3.4.1 Expres katepsinu B v nádorové tkáni

Stanovení exprese katepsinu B jsme provedli dle výše uvedené metodiky. Hodnotili jsme vztah exprese katepsinu B ve tkáni (*katepsin B pozitivní/katepsin B negativní nádory*) k gradingu malignity a stagingu nádoru. Expres katepsinu B v nádorové tkáni se podařilo stanovit ve vzorcích tkáně 119 pacientů s karcinomem močového měchýře. Z nich 83% (103/119) bylo katepsin B pozitivních, ze kterých pak jen u 9,7% (10/103) jsme zjistili výraznou expresi KB v nádoru (KB+++).

V podskupině povrchových nádorů (NMIBC) bylo 91% katepsin B pozitivních. Většina z nich byla však mírně (KB+) nebo středně pozitivních (KB++), pouze 17% z nich vykazovalo výraznou expresi katepsinu B (KB+++). V podskupině invazivních nádorů (MIBC) jsme zjistili 83% katepsin B pozitivních nádorů. Z nich pouze 7% mělo výraznou expresi katepsinu B v nádorové tkáni (KB+++). Rozdíl v počtu katepsin B pozitivních nádorů u pacientů s NMIBC a MIBC není statisticky významný ($p=0,23$).

Při posouzení exprese katepsinu B v nádorové tkáni v závislosti na gradingu malignity jsme našli ve skupině low-grade 92% nádorů katepsin B pozitivních (34/37). Osmdesát čtyři procent (69/84) high-grade nádorů bylo katepsin B pozitivních (tabulka č 29). Rozdíl v počtu katepsin B pozitivních nádorů u pacientů s low-grade a high-grade nádory není statisticky významný ($p=0,25$). Statisticky významný ($p=0,005$) rozdíl – mezi low-grade a high grade – v zastoupení nádorů s vysokým stupněm exprese KB (stupeň 3) a nádorů s nízkou nebo žádnou expresí KB (stupeň 0,1,2) v nádorové tkáni.

Tabulka 29 - 1 Expres katepsinu B v nádorové tkáni

Nádory	LG	HG (%)	NMIBC (%)	MIBC (%)
KB pozitivní	92%	84%	91%	83%
KB negativní	8%	16%	9%	17%

Dále jsme se pokusili odpovědět na otázku, zda existuje vztah mezi katepsin B pozitivními nádory a koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka 30 - Vztah mezi katepsin B pozitivními/negativními nádory a koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči u NMIBC

NMIBC KB pozitivní X negativní	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
Mann Whitney test			
P value (<0,05)	0,5392	0,7825	0,3109

Tabulka 31 - Vztah mezi katepsin B pozitivními/negativními nádory a koncentrací Pro-katepsinu B v séru a moči u MIBC

MIBC KB pozitivní X negativní	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
Mann Whitney test			
P value (<0,05)	NS	0,2181	0,0575

Tabulka 32 - Vztah mezi katepsin B+ nádory a koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči v závislosti na invazi nádoru

KB pozitivní	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
MIBC P value (<0,05)	0,4044	0,6022	0,7531
NMIBC P value (<0,05)	0,6052	0,238	0,2229

Tabulka 33 - Vztah mezi katepsin B +/- nádory a koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči u low grade nádorů

Low-grade nádory KB pozitivní X negativní	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
Mann Whitney test			
P value (<0,05)	0,7309	0,5334	0,1397

Tabulka 34 - Vztah mezi katepsin B +/- nádory a koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči u high nádorů

High-grade nádory KB pozitivní X negativní	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
Mann Whitney test			
P value (<0,05)	0,3435	0,3033	0,129

Tabulka 35 - Vztah mezi katepsin B negativními nádory a koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči v závislosti na gradingu malignity

KB negativní	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
LG XHG			
P value (<0,05)	0,8143	>0,9999	0,5363

Tabulka 36 - Vztah mezi katepsin B pozitivními nádory a koncentrací pro-katepsinu B v séru a moči v závislosti na gradingu malignity

KB pozitivní	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
LG XHG			
P value (<0,05)	0,0002	0,0002	<0,0001

U invazivních nádorů byl vztah mezi přítomnosti/nepřítomnosti exprese katepsinu B v nádorové tkáni a koncentrací U-pro-katepsinu B adjustovanou na hladinu kreatininu lehce nad hladinou statistické významnosti ($p=0,0575$). U ostatní parametrů – S-pro-katepsin B a U-pro-katepsin B – jsme neprokázali s nálezem katepsin B pozitivních/negativních nádorů. Naopak *vztah mezi nálezem exprese katepsinu B v nádorové tkáni a koncentracemi pro-katepsinu B v séru a moči, včetně U-pro-katepsin B/kreatinin byl vysoce signifikantní.*

3.4.2 Hodnocení koncentrace pro-katepsinu B/katepsinu B v séru a moči

Koncentrace katepsinu B i pro-katepsinu B byly měřeny ze zmrazených vzorků séra a moči metodou *ELISA* (podrobně viz metody).

Referenční rozmezí pro pro-katepsin B v séru je 27 – 126ng/ml a v moči je do 2,54ng/ml. Referenční rozmezí pro katepsin B v séru a moči nejsou stanoveny. *Při stanovení koncentrací pro-katepsinu B a katepsinu B v séru a moči v souboru pacientů i v kontrolním souboru jsme provedli celkem 980 měření. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách.*

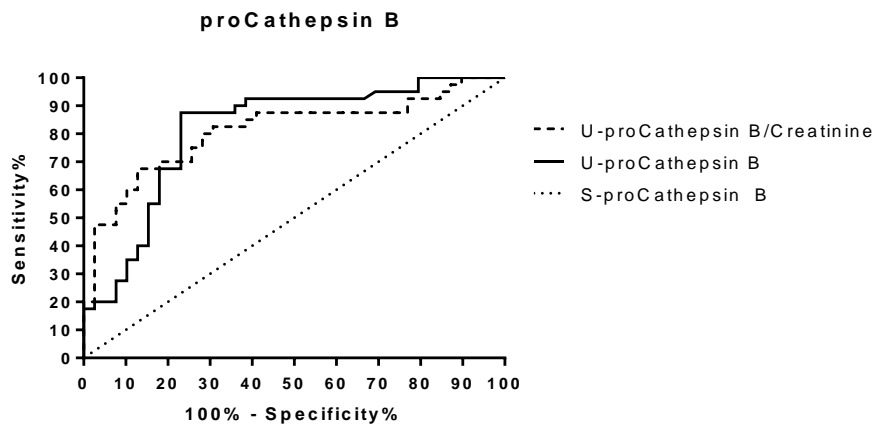
Tabulka 37 - Pro-katepsin B: pacienti versus kontrolní soubor (zdraví jedinci)

	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
Pacienti X kontrolní soubor			
P value	0,0006	<0,0001	<0,0001
Signifikantní rozdíl			
P value (<0,05)	ano	ano	ano

Tabulka 38 - Pro-katepsin B a katepsin B: pacienti versus kontrolní soubor

	Kontrolní skupina (zdraví jedinci)	Pacienti	P value
S-pro-katepsin B (µg/L), median (IQR)	58.7 (43.6- 75.8)	75.2 (24.1-102.0)	0,0006
U-pro-katepsin B (µg/L), median (IQR)	1.35 (0.9-2.3)	4.05 (2.3-9.22)	<0,0001
U-kreatinin (mmol/L), median (IQR)	8.0 (5.8-11.2)	7.4 (4.2-10.7)	0.11
U-pro-katepsin B/U-kreatinin (µg/mmol kreatinin), median (IQR)	0.19 (0.14-0.31)	0.64 (0.25-1.36)	<0,0001
S-katepsin B (µg/L), median (IQR)	4.24 (3.3-6.3)	5.6 (4.0-8.2)	0.02
U-katepsin B (µg/L), median (IQR)	0.89 (0.43-8.6)	5.3 (1.8-10.8)	0.0001
U-katepsin B /U-kreatinin, (µg/mmol kreatinin) median (IQR)	0.12 (0.06-0.82)	0.74 (0.20-1.75)	< 0.0001

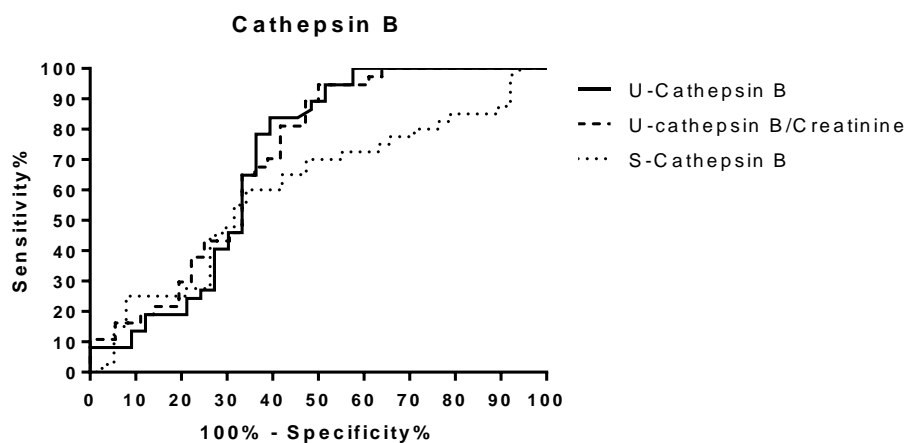
Rozdíl v koncentracích pro-katepsinu B a katepsinu B v séru a moči mezi pacienty s karcinomem močového měchýře a kontrolním souborem zdravých jedinců je vysoce statisticky významný. Diagnostická účinnost pro-katepsinu B a katepsinu B v séru a moči byla podroben ROC analýze se stanovením AUC (*area under the curve*). Výsledky jsou uvedeny v grafech a tabulkách na následujících obrázcích č. 8 a 9).



	AUC	95% CI
S-proCathepsin B	0.50	0.37 - 0.62
U-proCathepsin B	0.81	0.71 - 0.91
U-proCathepsin B/Creatinine	0.81	0.71 - 0.91

Obrázek 8: diagnostická účinnost pro-katepsinu B v séru a moči (ROC křivka a AUC)

Je zřejmé, že diagnostická účinnost pro-katepsinu B v moči je vysoká.

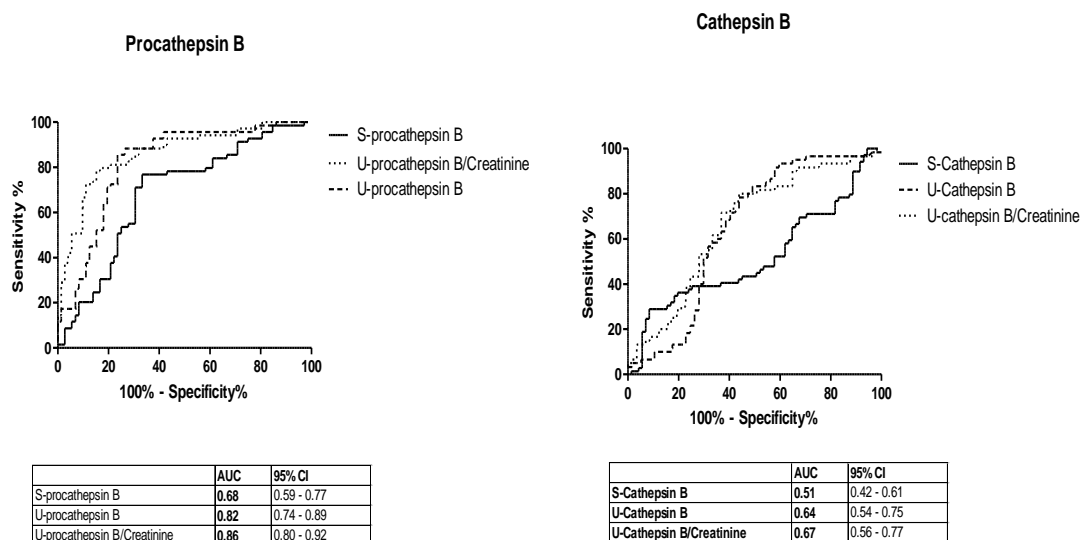


	AUC	95% CI
S-Cathepsin B	0.60	0.47 - 0.72
U-Cathepsin B	0.70	0.57 - 0.83
U-Cathepsin B/Creatinine	0.71	0.58 - 0.83

Obrázek 9: diagnostická účinnost katepsinu B v séru a moči (ROC křivka a AUC)

Tabulka 39 – Koncentrace pro-katepsinu B v séru a moči v závislosti na nádorové invazi

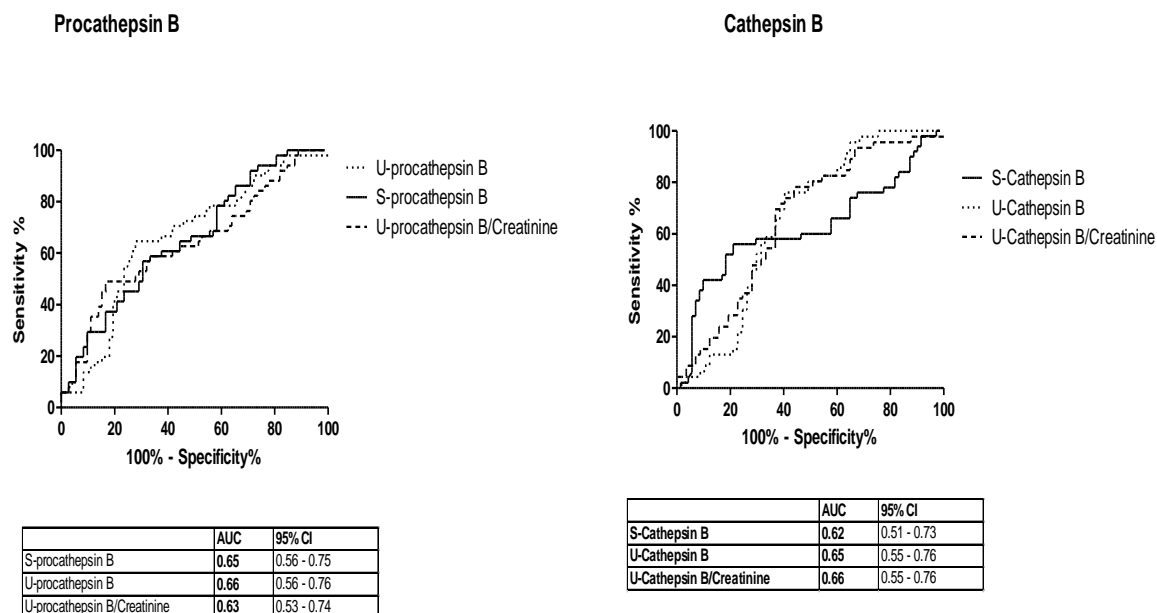
	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin	U-kreatinin
Mann Whitney test				
P value (<0,05)	0,0199	<0,0001	<0,0001	0,8378



	AUC	95% CI
S-procathepsin B	0.68	0.59 - 0.77
U-procathepsin B	0.82	0.74 - 0.89
U-procathepsin B/Creatinine	0.86	0.80 - 0.92

	AUC	95% CI
S-Cathepsin B	0.51	0.42 - 0.61
U-Cathepsin B	0.64	0.54 - 0.75
U-Cathepsin B/Creatinine	0.67	0.56 - 0.77

Obrázek 10 - Diagnostická účinnost pro-katepsinu B a katepsinu pro MIBC

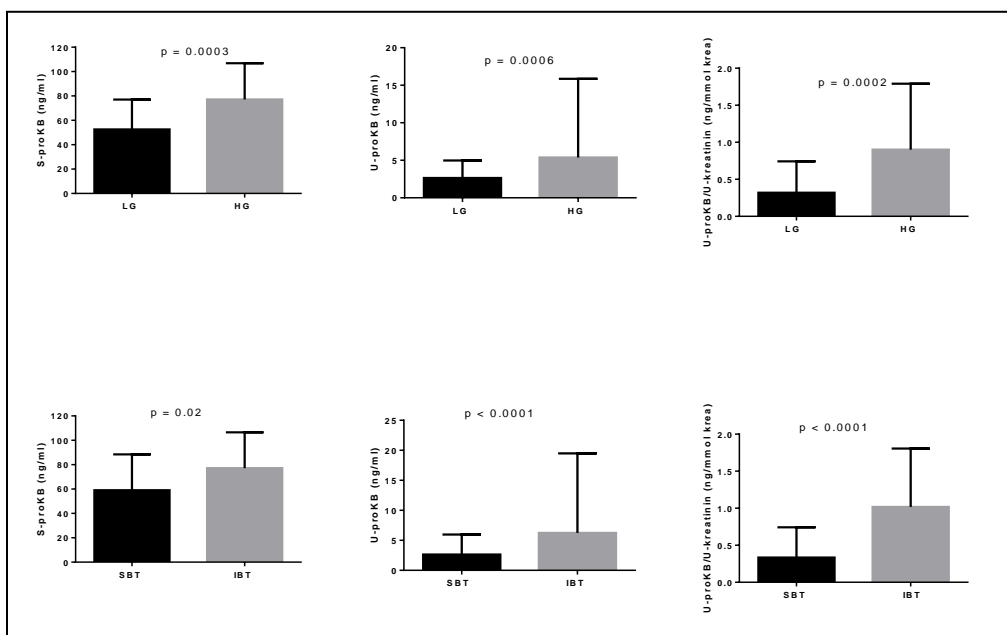


Obrázek 11 - Diagnostická účinnost pro-katepsinu B a katepsinu B pro NMIBC

Tabulka 40 – Koncentrace pro-katepsinu B v séru v závislosti na nádorové invazi a gradingu malignity

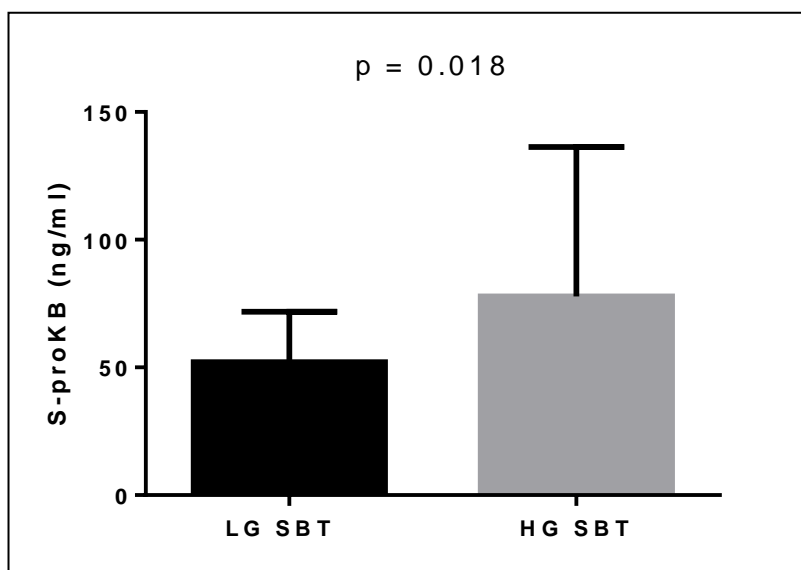
	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin	U-kreatinin
Mann Whitney test				
P value (<0,05)	0,0003	0,0006	0,0002	0,3245

Statisticky významný rozdíl byl zjištěn mezi koncentracemi pro-katepsinu B v závislosti na invazi nádoru a gradingu jeho malignity pouze při analýze v celém souboru. Tyto souvislosti jsou patrné i z následujících grafů (6 a 7).



(na grafech hodnota mediánu + IQR pro jednotlivé skupiny).

Graf č 6 – Pro-katepsin B v séru a moči v závislosti na gradingu malignity a invazi nádoru



(na grafu hodnota mediánu + IQR).

Graf č 7 – Pro-katepsin B v séru a moči v závislosti na gradingu malignity a invazi nádoru

Při analýze dat v rámci jednotlivých podskupin (tabulka č.41) již rozdíly nebyly statisticky významné, s výjimkou koncentrací pro-katepsinu B v séru mezi pacienty s high-grade a low-grade karcinomy v podskupině s povrchovým nádorem (p=0,0175).

Tabulka 41 - Pro-katepsin B v závislosti na gradingu malignity a invazi nádoru

	S-proKB	U-proKB	U-proKB/kreatinin
MBIC - HG X LG: P value (<0,05)	0,3845	0,6761	0,3158
NMBIC - HG X LG: P value (<0,05)	0,0175	0,4273	0,2769

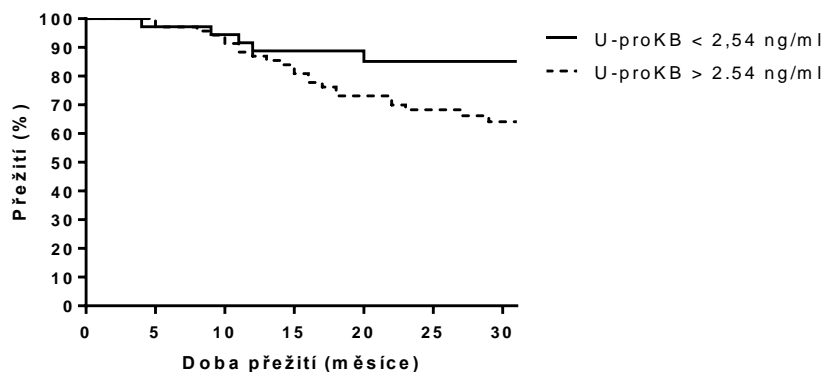
Změny v koncentracích pro-katepsinu B po transuretrální resekcii neinvazivních nádorů neumožňují – při uvedeném počtu pacientů v našem souboru s povrchovým nádorem – říci zda existuje souvislost mezi koncentrací pro-katepsinu B a recidivou NMIBC. **Na základě výsledků v našem souboru není tedy možné snížit počet endoskopických kontrol při sledování těchto pacientů.**

Analýza našich dat umožnila ale porovnání křivek přežití.

3.4.3 Porovnání křivek přežití

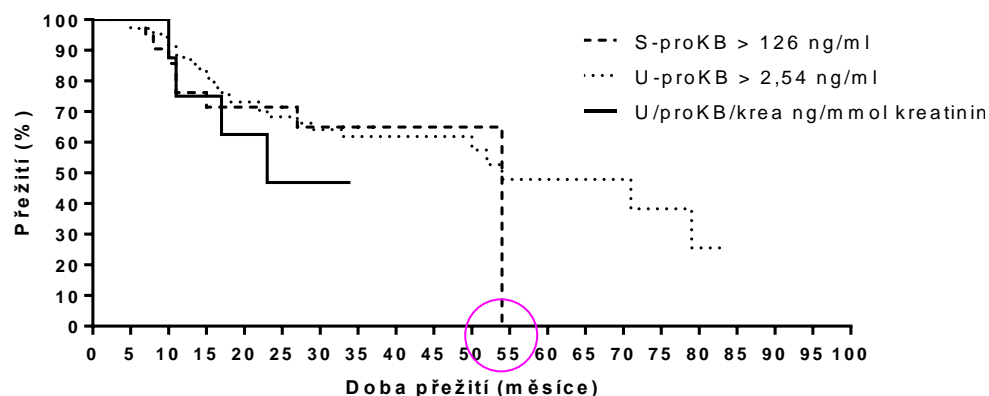
Průměrná délka přežití pacientů v celém souboru byla 30 měsíců.

S-proKB > 126 ng/ml - $p = 0.77$ (126 ng/ml je horní mez referenčního rozmezí) a U-proKB > 2,54 ng/ml - $p = 0.0194$ (2,54 ng/ml je horní mez referenčního rozmezí), viz graf č. 8.



Graf 8 - Křivky přežití (U-pro-katepsin B)

U-prokatepsin B/U-kreatinin > 2,84 ng/ mmol Kreatininu (horní mez 95% intervalu spolehlivosti) $p = 0,125$. Jak vyplývá z následujícího grafu (č. 8), tak všichni pacienti se S-proKB > 126 ng/ml umírají do 53 měsíců. Abychom mohli říci, že stanovení prokatepsinu B v séru by mohlo být vhodným prognostickým faktorem pro pacienty s nádorem močového měchýře, je nutné tento výsledek dále ověřit nejen delší dobou sledování stávajícího souboru pacientů, ale i na větším počtu pacientů



Graf 8 - Křivky přežití (S-pro-katepsin B, U-pro-katepsin B, U-pro-katepsin B/kreatinin)

3.5 Diskuze

Karcinom močového měchýře je nejčastějším zhoubným nádorem urogenitálního traktu. Z neinvazivních diagnostických metod je v klinické praxi standardně využívána pouze cytologie se svými limity. Existuje sice několik komerčně dostupných testů, které mají charakter nádorového markeru. Žádný z nich však zatím nebyl doporučen k standardní diagnostice nebo sledování pacientů s karcinomem močového měchýře (26, 57).

Dosud bylo publikováno málo studií zabývajících se koncentrací různých katepsinů v séru a moči (58). Výsledky uvedené v naší práci potvrzují, že jak koncentrace katepsinu B, tak i pro-katepsinu B stanovené v séru i v moči pacientů s karcinomem močového měchýře jsou významně zvýšené při porovnání s výsledky, které jsme zjistili u kontrolní skupiny zdravých jedinců (tabulka č. 38). Z podrobné a složité analýzy našich výsledků vyplývá, že koncentrace katepsinu B a pro-katepsinu B v séru a moči jsou nezávislé na gradingu nádoru. U-katepsin B a U-katepsin B/koncentrace kreatininu se vztahují k pohlaví. Hodnoty u mužů jsou významně zvýšené v porovnání s ženami ($p < 0.0001$, Mann-Whitney U-test). Koncentrace U-pro-katepsin B a U-pro-katepsin B/kreatinin také významně korelují s nádorovou invazí ($p < 0.0001$, Mann-Whitney U-test). Naše zjištění koreluje s některými výsledky jiných studií, které zkoumaly koncentrace katepsinů v tělních tekutinách u pacientů s karcinomem močového měchýře (59, 60, 61, 62, 63, 64).

Porovnáním AUC S-pro-katepsinu B s AUC U-pro-katepsinu B jasně ukazuje na výrazně vyšší diagnostickou účinnost U - pro-katepsinu B (AUC=0.50 vs AUC=0.81, $p=0,002$). Naproti tomu S-katepsin B a U-katepsin B vykazují podobnou diagnostickou efektivitu i přes to, že AUC pro U-katepsin B je vyšší než u AUC pro S-katepsin B (S-katepsin B – AUC = 0.60, U-katepsin B – AUC = 0.70, $p = 0.292$). Obdobné výsledky jsme zjistili stanovením AUC pro S-katepsin B a U-katepsin B/kreatinin (AUC = 0.60 vs AUC = 0.71, $p = 0.236$). Rozdíly v diagnostické účinnosti U-pro-katepsinu B a U-katepsinu B, jako i U-pro-katepsin /kreatininu a U-katepsin B/kreatinin jsou nevýznamné (AUC = 0.8125 vs je 0,70, $p=0.19$ a AUC = 0.81 vs 0.71, $p = 0.20$). Tyto nálezy získané vyšetřením vyššího počtu vzorků, než jsme publikovali v roce 2012 (59), se liší od výsledku práce, kterou prezentoval Svatek a spol. (62). Autoři této práce (62) porovnávali význam katepsinu B a katepsinu L v detekci karcinomu měchýře se závěrem, že není vztah mezi katepsinem B a tímto onemocněním (AUC = 57).

Přestože je pro-katepsin B biologicky inaktivní protein, snažili jsme se prozkoumat možný diagnostický vztah mezi neaktivní (pro-katepsin B) a aktivní (katepsin B) formou enzymů. Zhodnotili jsme diagnostickou účinnost obou v séru a v moči v závislosti na invazi nádoru. Jak je patrné z obrázku 10 a obrázku 11, je diagnostická efektivita obou forem jak v séru, tak i v moči odlišná. Naše výsledky dále ukazují na to, že U-pro-katepsin B a U-pro-katepsin B/kreatinin ukazují na významný diagnostický význam pro identifikaci pacientů s invazivní nádory (AUC = 0.82 a 0,86).

Nedávné srovnávací studie popisují řadu relevantních biochemických markerů (BTA, NMP22) v souvislosti s diagnostikou karcinomu močového měchýře (65, 66, 67). Nicméně, všechny tyto studie jsou zaměřeny na vyšetřování biologicky aktivních proteinů. Pro-katepsin B je biologicky neaktivní molekula, která vykazuje významnou účinnost při vyšetřování pacientů s karcinomem močového měchýře. Z tohoto úhlu pohledu se jeví výsledky naší studie jako původní, což nám také potvrdili i recenzenti naší poslední publikace.

3.6 Závěry

1. Při stanovení exprese katepsinu B v nádorové tkáni bylo 83% nádorů katepsinu B pozitivních
2. Jen 9,7% katepsinu B pozitivních nádorů vykazovalo výraznou expresi katepsinu B (stupeň 3+)
3. Rozdíl v počtu katepsinu B pozitivních nádorů u pacientů s NMIBC a MIBC není statisticky významný.
4. Vztah mezi nálezem exprese katepsinu B v nádorové tkáni a koncentracemi pro-katepsinu B v séru a moči, včetně U-pro-katepsinu B/kreatinin byl *vysoce statisticky signifikantní*
5. Rozdíl v koncentracích pro-katepsinu B a katepsinu B v séru a moči mezi pacienty s karcinomem močového měchýře a kontrolním souborem zdravých jedinců je *vysoce statisticky významný*
6. Diagnostická účinnost pro-katepsinu B v moči je vysoká
7. Všichni pacienti se S-pro- katepsin B > 126 ng/ml umírají do 53 měsíců
8. Na základě výsledků v našem souboru není možné snížit počet endoskopických kontrol při sledování pacientů s neinvazivním nádorem

Shrnutí cílů:

- a) *Klinická užitečnost stanovení koncentrace pro-katepsinu B a katepsinu B v séru se neliší, klinická užitečnost pro-katepsinu je v moči vyšší než katepsinu B*
- b) *Stanovení koncentrací pro-katepsinu B v moči a pro-katepsinu B v moči adjustovaného na kreatinin by mohlo přispět k dřívějšímu stanovení diagnózy karcinomu močového měchýře*
- c) *Stanovení pro-katepsinu B v séru je možné využít jako prognostický faktor u pacientů s karcinomem močového měchýře*
- d) *Katepsin B i pro-katepsin B nejsou vhodné k neinvazivnímu monitorování léčby NMIBC*
- e) *Stanovení katepsinu B, respektive pro-katepsinu B by v klinické praxi nemužnilo snížit frekvenci cystoskopického vyšetření*

3.7 Citovaná literatura

1. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2013 Feb;63(2):234-41.
2. <http://www.svod.cz>
3. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>
4. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 16/01/2015.
5. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R. et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*. 2001;19:666–75. [
6. Yu RJ, Stein JP, Cai J, Miranda G, Groshen S, Skinner D. Superficial (pT2a) and deep (pT2b) muscle invasion in pathological staging of bladder cancer following radical cystectomy. *J Urol*. 2006 Aug;176(2):493-8; discussion 498-9.
7. Rosenberg JE, Carrol PR, et al. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol* 2005 Jul; 174 (1): 14-20
8. Bosetti C, Bertuccio P, Chatenoud L, et al. Trends in mortality from urologic cancers in Europe, 1970-2008. *Eur Urol* 2011 Jul;60(1):1-15.
9. N.D. Freedman, D.T. Silverman, A.R. Hollenbeck, A. Schatzkin, C.C. Abnet. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women [published correction appears in *JAMA* 2011;306:2220]. *JAMA*. 2011;306:737-745
10. Chalasani V., Chin J.L., Izawa J.I. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. *Can Urol Assoc J*. 2009 Dec; 3(6 Suppl 4): S193–S198.
11. El-Sebaie M, Zaghoul MS, Howard G, et al. Squamous cell carcinoma of the bilharzial and non-bilharzial urinary bladder: A review of etiological features, natural history, and management. *Int J Clin Oncol*. 2005;10:20–5.
12. Ghoneim MA, el-Mekresh MM, el-Baz MA, et al. Radical cystectomy for carcinoma of the bladder: Critical evaluation of the results in 1,026 cases. *J Urol*. 1997;158:393–9
13. Clinical outcomes following radical cystectomy for primary nontransitional cell carcinoma of the bladder compared to transitional cell carcinoma of the bladder. Rogers CG, Palapattu GS, et al. *J Urol*. 2006 Jun; 175(6):2048-53; discussion 2053.
14. Differences in survival among patients with urachal and nonurachal adenocarcinomas of the bladder. Wright JL, Porter MP, et al. *Cancer*. 2006 Aug 15; 107(4):721-8.
15. Mukesh M, Cook N, Hollingdale AE, et al. Small cell carcinoma of the urinary bladder: A 15-year retrospective review of treatment and survival in the Anglian Cancer Network. *BJU Int*. 2009;103:747–52.
16. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C, eds. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009 Dec; pp. 262-265.
17. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, et al. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998 Dec;22(12):1435-48.
18. Sauter G, Algaba F, Amin M, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. WHO classification of

- classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARCC Press, 2004, pp. 29-34.
19. Pan CC, Chang YH, Chen KK, et al. Prognostic significance of the 2004 WHO/ISUP classification for prediction of recurrence, progression, and cancer-specific mortality of non-muscle-invasive urothelial tumors of the urinary bladder: a clinicopathologic study of 1,515 cases. *Am J Clin Pathol* 2010 May;133(5):788-95.
 20. Babjuk M. Transuretrální resekce v léčbě neinvazivních a povrchově invazivních (Ta,T1) nádorů močového měchýře. *Endoskopie* 2008; 18(4): 167-171
 21. Holmang S, Hedelin H, Anderstrom C, et al. Long-term follow-up of a bladder carcinoma cohort: routine followup urography is not necessary. *J Urol* 1998 Jul;160(1):45-8.
 22. Palou J, Rodriguez-Rubio F, Huguet J, et al. Multivariate analysis of clinical parameters of synchronous primary superficial bladder cancer and upper urinary tract tumours. *J Urol* 2005 Sep;174(3):859-61.
 23. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, et al. Upper urinary tract tumours after primary superficial bladder tumours: prognostic factors and risk groups. *J Urol* 2000 Oct;164(4):1183-7.
 24. Sobin LH, et al. eds. TNM classification of malignant tumors. International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009 Dec; pp. 262-265. Czech Edition Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic, 2011.
 25. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol* 2009 Jun;22 Suppl 2:S53-9.
 26. Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology*. 2003 Jan;61(1):109-18;discussion 18.
 27. Raitanen M-P, Aine R, Rintala E, et al; FinnBladder Group. Differences between local and review urinary cytology and diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol* 2002 Mar;41(3):284-9.
 28. Babjuk M, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol*. 2013 Oct;64(4):639-53. doi: 10.1016/j.eururo.2013.06.003. Epub 2013 Jun 12.
 29. Darwiche F, et al. Biomarkers for non-muscle invasive bladder cancer: Current tests and future promise. *Indian J Urol* 2015;31:273-82
 30. Li HX, et al. ImmunoCyt and cytokeratin 20 immunocytochemistry as adjunct markers for urine cytologic detection of bladder cancer: A prospective study. *Anal Quant Cytol Histol* 2010;32:45-52.
 31. Mahnert B, et al. Measurements of complement factor H-related protein (BTA-TRAK assay) and nuclear matrix protein (NMP22 assay)—useful diagnostic tools in the diagnosis of urinary bladder cancer? *Clin Chem Lab Med* 2003;41:104-10
 32. Thomas L, et al. Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin Chem* 1999;45:472-7
 33. Shariat SF, et al. Variability in the performance of nuclear matrix protein 22 for the detection of bladder cancer. *J Urol* 2006;176:919-26
 34. Gupta NP, et al. Nuclear matrix protein 22 as adjunct to urine cytology and cystoscopy in follow-up of superficial TCC of urinary bladder. *Urology* 2009;73:592-7.
 35. Hwang EC, et al. Use of the NMP22 BladderChek test in the diagnosis and follow-up of urothelial cancer: A cross-sectional study. *Urology* 2011;77:154-9.
 36. Sokolova IA, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *J Mol Diagn* 2000;2:116-23.

37. Whitson J, et al. A multicolour fluorescence *in situ* hybridization test predicts recurrence in patients with high-risk superficial bladder tumours undergoing intravesical therapy. *BJU Int* 2009;104:336-9.
38. Lodde M, et al. Recurrence and progression in patients with non-muscle invasive bladder cancer: Prognostic models including multicolor fluorescence *in situ* hybridization molecular grading. *Int J Urol* 2014;21:968-72.
39. Witjes JA, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol.* 2014 Apr;65(4):778-92
40. Jarolím L. Derivace moči po cystektomii. *Urol List* 2008;6(2): 53-59
41. Mayr R, et al. Comorbidity and performance indices as predictors of cancer-independent mortality but not of cancer-specific mortality after radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2012 Oct;62(4):662-70.
42. Stein JP, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol* 2001 Feb;19(3):666-75.
43. Gschwend JE, et al.. Disease specific survival as endpoint of outcome for bladder cancer patients following radical cystectomy. *Eur Urol* 2002 Apr;41(4):440-8.
44. Mameghan H, et al. Analysis of failure following definitive radiotherapy for invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995 Jan;31(2):247-54.
45. De Neve W, Lybeert ML, Goor C, et al. Radiotherapy for T2 and T3 carcinoma of the bladder: the influence of overall treatment time. *Radiother Oncol* 1995 Sep;36(3):183-8.
46. Soto Parra H, et al. Three-week versus four-week schedule of cisplatin and gemcitabine: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol.* 2002;13(7): 1080–1086.
47. von der Maase H, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(21):4602–4608.
48. Sternberg CN, et al. Seven year update of an EORTC phase III trial of high-dose intensity M-VAC chemotherapy and G-CSF versus classic M-VAC in advanced urothelial tract tumours. *Eur J Cancer.* 2006; 42(1):50–54.
49. Bellmunt J, et al. Randomized phase III study comparing paclitaxel/cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergroup Study 30987. *J Clin Oncol.* 2012;30(10):1107–1113.
50. Stoka V, et al. Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis. *Life* 2005 April-May;57(4/5):347-353
51. Yan S, Sloane BF. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol Chem* 2003 Jun;384 (6): 845-54
52. http://www.atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CTSB
53. Fong D, et al. Confirmation of the human cathepsin B gene (CTSB) assignment to chromosome 8. *Hum GFenet.* 1992 Apr;89(1):10-2
54. Gong Q, et al. Characterization of the cathepsin BV gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. *DNA Cell Biol.* 1993 May;12(4):299-309
55. Hook VY. Unique neuronal functions of cathepsin L and cathepsin B in secretory vesicles: biosynthesis of peptides in neurotransmission and neurodegenerative disease. *Biol Chem.* 2006 Oct-Nov;387(10-11):1429-39
56. DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web <http://www.pymol.org>

57. Lotan Y, et al. Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urol Oncol* 2010;28:441-8.
58. Gorodkiewicz E, et al. Cathepsin D serum and urine concentration in superficial and invasive transitional bladder cancer as determined by surface plasmon resonance imaging. *Oncol Lett* 2014;8:1323-7.
59. Kotaska K, et al. Urine and serum cathepsin B concentrations in the transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Lab Anal* 2012;26:61-5.
60. Staack A, et al. Cathepsins B, H, and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2002;59:308-12.
61. Staack A, et al. Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2004;63:1089-94.
62. Svatek RS, et al. Role of urinary cathepsin B and L in the detection of bladder urothelial cell carcinoma. *J Urol* 2008;179:478-84; discussion 84.
63. Eijan AM, et al. Cathepsin B levels in urine from bladder cancer patients. *Oncol Rep* 2000;7:1395-9.
64. Eijan AM, et al. High expression of cathepsin B in transitional bladder carcinoma correlates with tumor invasion. *Cancer* 2003;98:262-8.
65. Babjuk M, et al. Urinary cytology and quantitative BTA and UBC tests in surveillance of patients with pT_{ap}T₁ bladder urothelial carcinoma. *Urology* 2008;71:718-22.
66. Abd El Gawad IA, et al. Comparative study of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of bladder cancer. *J Egypt Natl Canc Inst* 2005;17:193-202.
67. Casetta G, Gontero P, Zitella A, Pelucelli G, Formiconi A, Priolo G, Martinasso G, Mengozzi G, Aimo G, Viberti L, Tizzani A. BTA quantitative assay and NMP22 testing 9 compared with urine cytology in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int* 2000;65:100-5

3.8 Souhrn

Karcinom močového měchýře je nejčastějším zhoubným nádorem urogenitálního traktu. Z neinvazivních diagnostických metod je v klinické praxi standardně využívána pouze cytologie se svými limity. Existuje sice několik komerčně dostupných testů, které mají charakter nádorového markeru. Žádný z nich však zatím nebyl doporučen k standardní diagnostice nebo sledování pacientů s karcinomem močového měchýře. Katepsin B je thiol – dependentní proteáza nalézající se za normálních okolností v lysosomech savčích buněk. Katepsin B se lysosomech podílí na degradaci proteinů a má různé funkce v udržení metabolismu buněk za fyziologických stavů. Výskyt katepsinu B anebo jeho proteinů a jejich vysoká aktivita je popsána u celé řady nádorových onemocnění. O jeho významu u urologických nádorů bylo dosud jen velmi málo zpráv. Aktivitu katepsinu B u pacientů s karcinomem močového měchýře jsme zjišťovali stanovením jeho exprese v nádorové tkáni a stanovením koncentrace katepsinu B a pro-katepsinu B v jejich séru moči. Naše výsledky potvrzují, že diagnostická účinnost pro-katepsinu B v moči je vysoká. Všechny dosud publikované studie jsou zaměřeny na vyšetřování biologicky aktivních proteinů. Pro-katepsin B je biologicky neaktivní molekula, která vykazuje významnou účinnost při vyšetřování pacientů s karcinomem močového měchýře. Z tohoto úhlu pohledu se jeví výsledky naší studie jako původní.

Klíčová slova: karcinom měchýře, lysozomální enzymy, katepsin B, pro-katepsin B

Summary

Bladder cancer is the most common malignant neoplasm of the urogenital tract. Of non-invasive diagnostic methods in clinical practice normally only is used cytology to its limits. While there are several commercially available tests that have the character of a tumor marker. None of them, however, has not yet been recommended for the standard diagnosis or monitoring of patients with bladder cancer. Cathepsin B is a thiol – dependent protease found in normal circumstances in the lysosomes of mammalian cells. Cathepsin B are lysosomes involved in the degradation of proteins and has various functions in maintaining cell metabolism in normal conditions. The incidence of cathepsin B or its proteins and their high activity is described in a number of neoplastic diseases. About its importance for urological tumors has so far been only very few reports. Activity of the cathepsin B in patients with invasive bladder cancer were examined by determining its expression in tumor tissue and determining the concentrations of cathepsin B and pro-cathepsin B in their serum urine. Our results confirm that the diagnostic efficiency of the pro-cathepsin B urine urine is high. All so far published studies are focused on the investigation of biologically active proteins. Pro-cathepsin B is the biologically inactive molecule, which exhibits significant efficacy in the investigation of patients with carcinoma of the urinary bladder. From this point of view appears to be the results of our study as the original.

Keywords: bladder cancer, lysosomal enzymes, cathepsin B, pro-cathepsin B

4 Publikace výsledků se vztahem k tématu dizertace

1. Kotaska K, Dusek P, Prusa R, Vesely S, Babjuk M. Urine and Serum Cathepsin B Concentrations in the Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 26: 61–65 (2012). IF 1,384
2. Pavel Dusek, Karel Kotaska, Stepan Vesely, Richard Prusa, Marek Babjuk. Diagnostic efficiency of Serum and Urine ProCathepsin B and Cathepsin B in Patients with Carcinoma of the Urinary Bladder. *Clinical Laboratory*, ISSN 1433-6510, in press, IF 1,19

5 Abstrakta se vztahem k tématu dizertace

1. P Dusek, R. Prusa, K. Kotaska, S.Vesely, M. Bunesova, M. Babjuk. Cathepsin B in the diagnosis of the transitional cell cancer of the bladder. Clinical Chemistry Vol 56, No 6, , Supplement 2010, pg. A 197
2. Dusek P, Kotaska K, Vesely S, Prusa R, Babjuk M. Cathepsin B in the Diagnosis of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. Urology, 78, Sep 2011, Supplement 3A, Pages 199, UP 01.047
3. K.Kotaska, P.Dusek, S.Vesely, R.Prusa, M.Babjuk. Cathepsin B and ProCathepsin B in Diagnosis of Transient Cell Carcinoma of the Bladder. Clin Chem Lab Med 2014, 52, Special Suppl, ppS1-S1760, June 2014, Cod:0260

6 Dedikace grantu

Práce vznikla s podporou grantu *IGA MZ ČR NT/11415*

7 Poděkování

Závěrem bych rád vyjádřil poděkování přednostovi Urologické kliniky 2. Lf UK a FN Motol Prof. MUDr. Marku Babjukovi CSc. nejen za impuls, který vnesl do mé práce po mém příchodu do Motola, ale i za cennou pomoc v průběhu mého postgraduálního studia. Dále bych chtěl vyjádřit poděkování za spolupráci Doc. Ing. Karlu Kotaškovi Ph.D. z Ústavu klinické biochemie a patobiochemie 2.lf UK a FNM, RNDr. Marcele Mrhalové Ph.D. z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2.lf UK a FNM a dalším spolupracovníkům z těchto pracovišť. Dále bych chtěl vyjádřit poděkování za podporu as. MUDr. Štěpánu Veselému Ph.D. a Doc. Ladislavu Jarolímovi CSc. za jejich podporu. V neposlední řadě chci také poděkovat své manželce a ostatním členům rodiny za jejich podporu a trpělivost.