

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. lékařská fakulta**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**2018**

**MUDr. Antonín Brisuda**

**Univerzita Karlova  
2. lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie



**MUDr. Antonín Brisuda, FEBU**

*Neinvazivní diagnostika uroteliálního karcinomu močového měchýře  
stanovením volné DNA a microRNA v moči*

*Non-invasive diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder by  
evaluation of cell-free DNA and microRNA in urine*

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Urologická klinika 2.LF UK a FN Motol, Praha

Praha, 2018

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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, 16.9.2018

Antonín Brisuda

Podpis

Identifikační záznam:

Brisuda, Antonín. *Neinvazivní diagnostika uroteliálního karcinomu močového měchýře stanovením volné DNA a microRNA v moči. [Non-invasive diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder by evaluation of cell-free DNA and microRNA in urine]*. Praha, 2018. Počet stran 104, počet příloh 0. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Urologická klinika. Školitel Babjuk, Marek.

## Seznam zkratek

|               |   |
|---------------|---|
| <b>ASR-W</b>  | <b>Age-Standardised Rate (World) = přepočít na světový standard</b> |
| <b>BTA</b>    | Bladder tumour antigen  |
| <b>cfDNA</b>  | Cell-free deoxyribonucleic acids                                    |
| <b>CIS</b>    | Carcinoma in situ   |
| <b>CK</b>     | Cytokeratin   |
| <b>CT-IVU</b> | Computed Tomography – Intravenous Urography                         |
| <b>CTLA-4</b> | Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4                         |
| <b>CXCL-1</b> | Skupina chemokinů funkčně spojená s tumorigenezí                    |
| <b>DAVID</b>  | Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery     |
| <b>DNA</b>    | Deoxyribonukleová kyselina  |
| <b>EAU</b>    | European Association of Urology                                     |
| <b>EMA</b>    | European Medicines Agency = evropský úřad pro kontrolu léčiv        |
| <b>EORTC</b>  | European Organisation for Research and Treatment of Cancer          |
| <b>FDA</b>    | The Food and Drug Administration = americký úřad pro kontrolu léčiv |
| <b>FISH</b>   | Fluorescent in situ hybridization                                   |
| <b>GAPDH</b>  | Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza                                |
| <b>HG</b>     | High grade = nízký stupeň buněčné diferenciacce                     |
| <b>LG</b>     | Low grade = vysoký stupeň buněčné diferenciacce                     |
| <b>LOH</b>    | Loss of heterozygosity  |
| <b>Mcm</b>    | Mini chromosome maintenance protein                                 |
| <b>MIBC</b>   | Muscle-Invasive Bladder Cancer                                      |
| <b>MMP</b>    | Matrixové metaloproteázy  |
| <b>NMIBC</b>  | Non-Muscle Invasive Bladder Cancer                                  |
| <b>NMM</b>    | Nádory močového měchýře   |
| <b>NMP22</b>  | Nuclear matrix protein 22   |
| <b>PAP</b>    | Klasifikace podle Papanicolaou (jedna z klasifikací cytologie)      |
| <b>PCR</b>    | Polymerázová řetězová reakce  |
| <b>PD-1</b>   | Programmed cell death protein 1                                     |
| <b>PD-L1</b>  | Programmed death-ligand 1   |
| <b>Plk 1</b>  | Mitotická kináza Polo-like 1  |
| <b>PSA</b>    | Prostatický specifický antigen                                      |
| <b>qPCR</b>   | Quantitative PCR (real time)  |
| <b>RNA</b>    | Ribonukleová kyselina   |
| <b>RT-PCR</b> | Reverse transcription polymerase chain reaction                     |
| <b>SELDI</b>  | Surface enhanced laser desorption/ionisation                        |
| <b>TA DNA</b> | Celkové množství (Total Amount) volné DNA v moči                    |
| <b>TNM</b>    | Tumor-Node-Metastasis   |
| <b>TUR</b>    | Transuretrální resekce nádoru močového měchýře                      |
| <b>UBC®</b>   | Urinary bladder cancer  |
| <b>ucfDNA</b> | Urinary cell-free deoxyribonucleic acids                            |
| <b>UK</b>     | Uroteliální karcinom  |
| <b>WHO</b>    | World Health Organisation   |

# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| Seznam zkratk  | 5         |
| <b>1. Úvod do problematiky nádorů močového měchýře</b>   | <b>8</b>  |
| 1.1 Epidemiologie  | 8         |
| 1.2 Etiologie  | 13        |
| 1.3 Patologie a stádia onemocnění  | 15        |
| 1.4 Prognostické faktory   | 17        |
| 1.5 Léčba  | 21        |
| <b>2. Neinvazivní diagnostika</b>  | <b>24</b> |
| 2.1 Úvod   | 24        |
| 2.2 Přehled dostupných markerů   | 28        |
| 2.3 Proteiny buněčného cyklu   | 35        |
| 2.4 Genomová analýza   | 36        |
| 2.4.1 Proteomika   | 37        |
| 2.4.2 Epigenetika  | 37        |
| 2.4.3 Genomika   | 38        |
| 2.4.4 Volná DNA (cfDNA)  | 38        |
| 2.4.5 Micro RNA (miRNA)  | 40        |
| <b>3. Kvantifikace volné DNA v moči pacientů jako neinvazivní biomarker k detekci uroteliálního karcinomu močového měchýře</b> | <b>44</b> |
| 3.1 Hypotézy a cíle práce  | 44        |
| 3.2 Materiál a metodika  | 45        |
| 3.3 Statistická analýza  | 48        |
| 3.4 Výsledky   | 48        |
| 3.5 Diskuze  | 60        |
| 3.6 Závěry   | 63        |
| <b>4. MicroRNA v moči pacientů jako neinvazivní biomarker k detekci uroteliálního karcinomu močového měchýře</b>               | <b>64</b> |
| 4.1 Hypotézy a cíle práce  | 64        |
| 4.2 Materiál a metodika  | 65        |
| 4.3 Výsledky   | 71        |
| 4.4 Diskuze  | 78        |

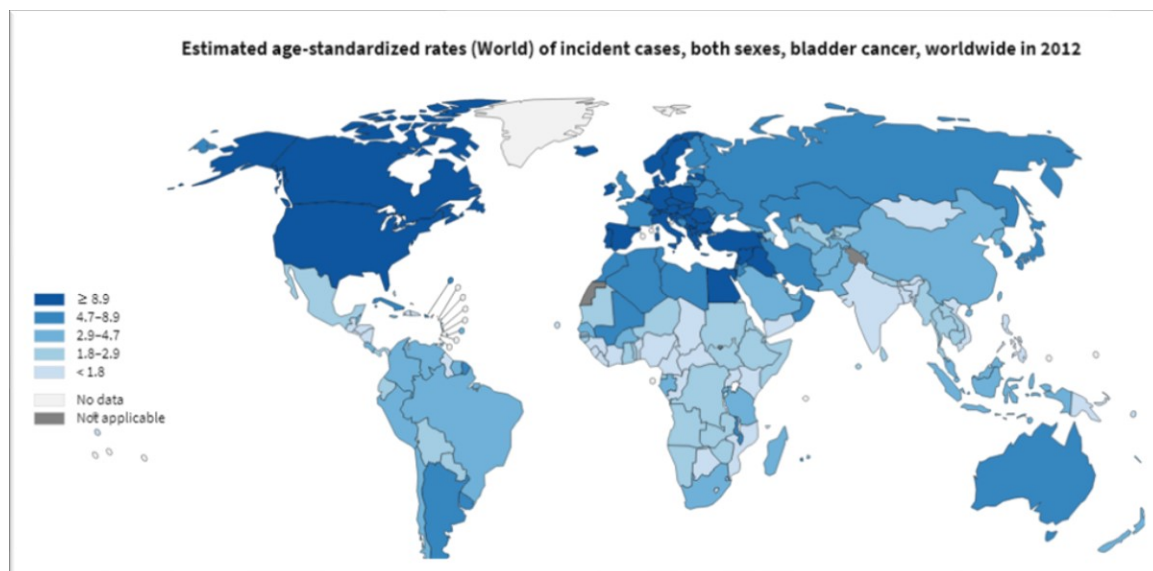
|  |     |
|--|-----|
| 4.5 Závěry.....  | 81  |
| 5. Literatura .....                                      | 82  |
| 6. Souhrn.....   | 100 |
| 7. Publikace výsledků se vztahem k tématu dizertace..... | 103 |
| 8. Dedikace grantu .....                                 | 103 |
| 9. Poděkování .....                                      | 104 |

# 1. Úvod do problematiky nádorů močového měchýře

## 1.1 Epidemiologie

Nádory močového měchýře (NMM) jsou mezi muži celosvětově sedmou nejčastěji diagnostikovanou malignitou, a pokud jsou zahrnuta obě pohlaví, patří jim 11. místo (1). Nejvyšší incidenci vykazují USA, západní Evropa a Egypt, nejnižší naopak asijské země (1) (Graf 1). Při hodnocení epidemiologických dat je však třeba brát na zřetel rozdílnou kvalitu sběru dat, jejich hodnocení a rozdílnou metodologii (2). Vysoká incidence a prevalence v rozvinutých zemích společně s vysokou mírou vzniku recidiv u těchto nádorů jsou příčinou enormní globální zátěže pro zdravotní systémy (3).

**Graf 1. Globální rozložení incidence NMM v roce 2012 (světový standard podle věku pro obě pohlaví) (převzato z 1).**

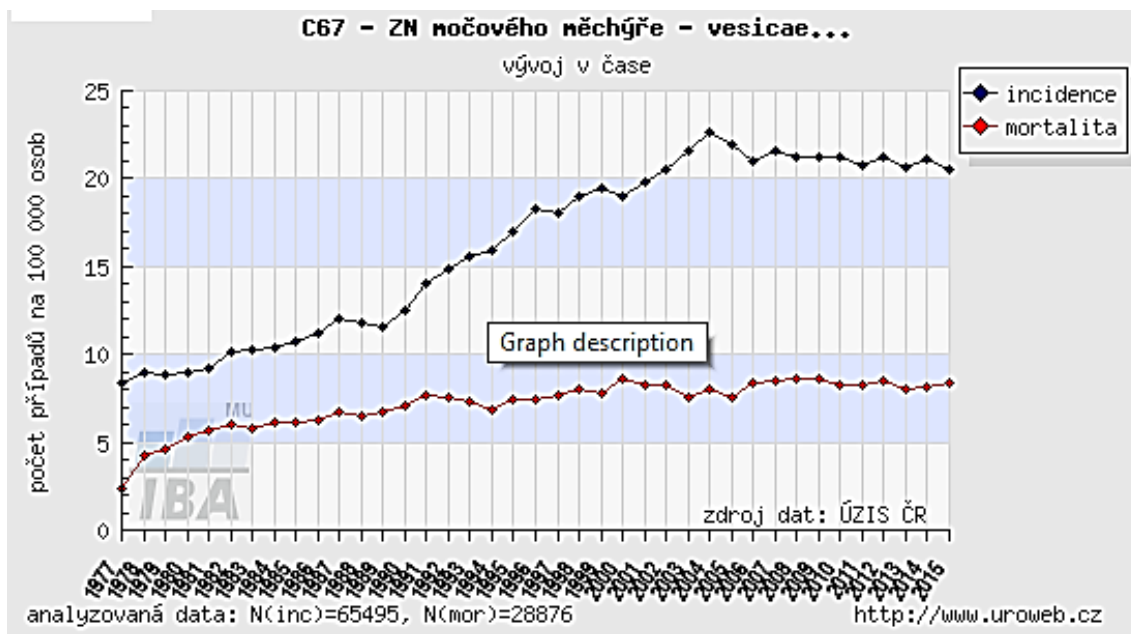


Při zvyšující se spotřebě tabákových výrobků a expozici kancerogenním látkám v průmyslu lze v budoucnu očekávat nárůst incidence nádorů

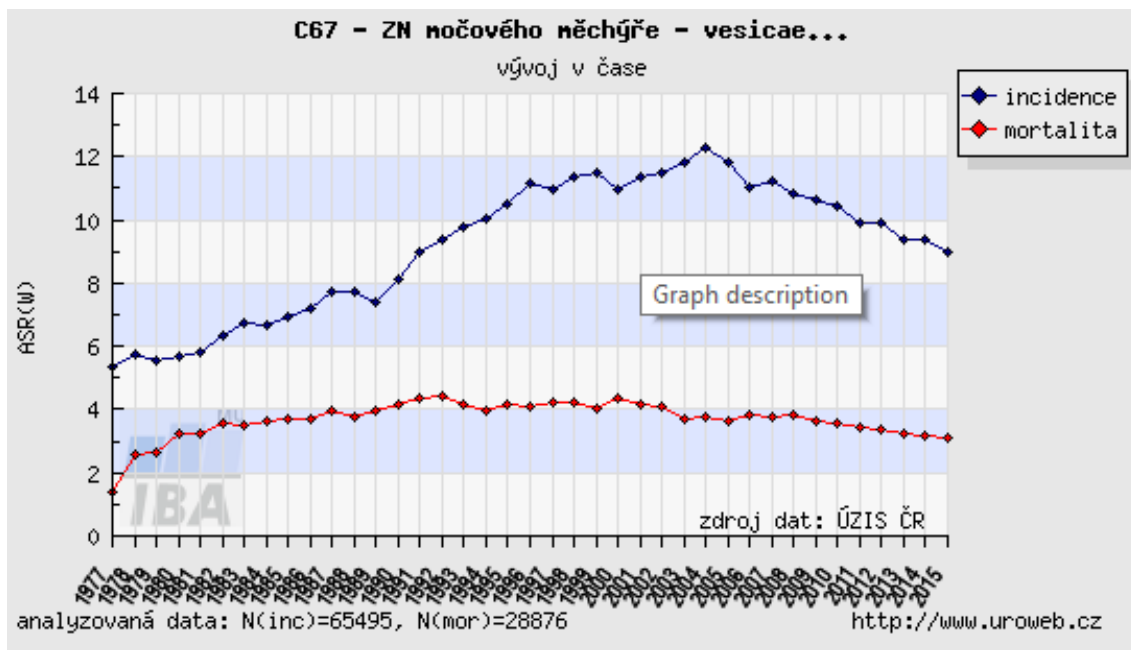


močového měchýře v rychle se ekonomicky rozvíjejících asijských zemích, jako je například Čína (4). V České republice incidence NMM v posledních 10 letech stagnuje zhruba na hodnotě 21 případů na 100 000 obyvatel, přičemž u mužů je přibližně trojnásobná než u žen (5) (Graf 2). Pokud se podíváme na stejná data vztažená na světový průměr (ASR-W), zjistíme dokonce mírný pokles (Graf 3). Globálně tedy incidence mírně roste, jak již bylo zmíněno v souvislosti s trendy v zemích třetího světa a některých asijských zemích. V rámci Evropské unie je incidence NMM 19,1 případů na 100 000 obyvatel/rok u mužů a 4 u žen (1). Nejvyšší incidence je pozorována v Belgii, zatímco nejnižší ve Finsku (1) (Tab. 1). Mortalita standardizovaná podle věku byla v roce 2012 celosvětově u mužů 3,2 úmrtí/100 000 obyvatel/rok a u žen 0,9 (1). V České republice byla v roce 2015 mortalita u mužů 12,1/100 000 obyvatel/rok a u žen 4,85/100 000 obyvatel/rok, přičemž trend v posledních 10 letech přibližně kopíruje trend incidence (5) (Graf 2, Graf 3).

**Graf 2. Vývoj incidence a mortality zhoubného novotvaru močového měchýře v České republice (počet na 100 000 obyvatel/rok) (převzato z 5).**



**Graf 3. Vývoj incidence a mortality zhubného novotvaru močového měchýře v České republice (přepočten na světový standard podle věku) (převzato z 5).**

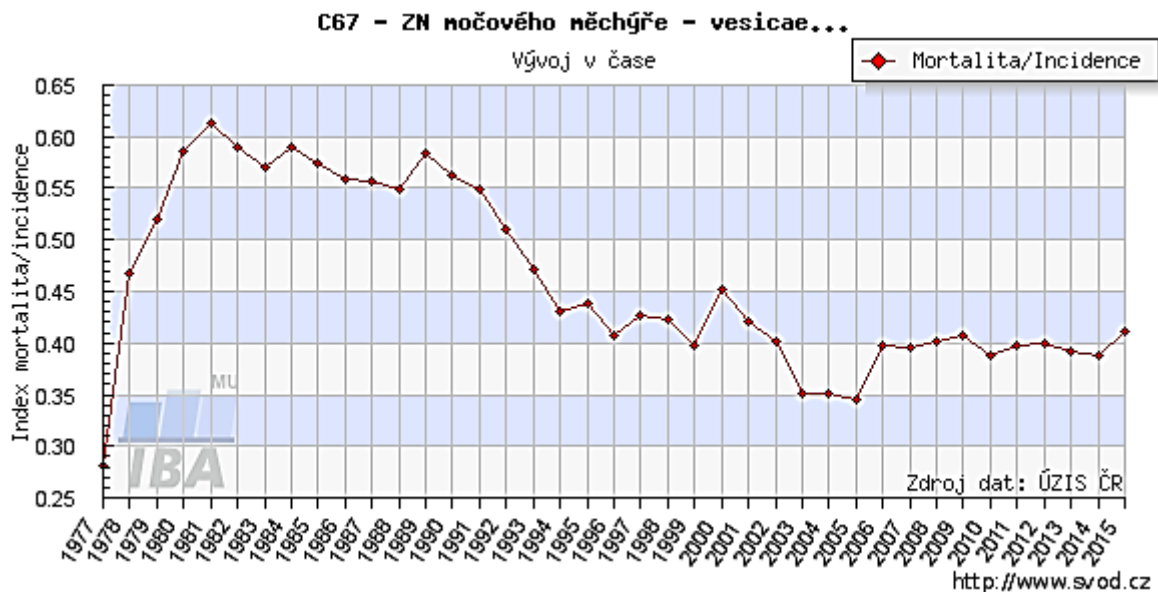


**Tab. 1. Incidence NMM v Evropské unii (převzato z 1).**

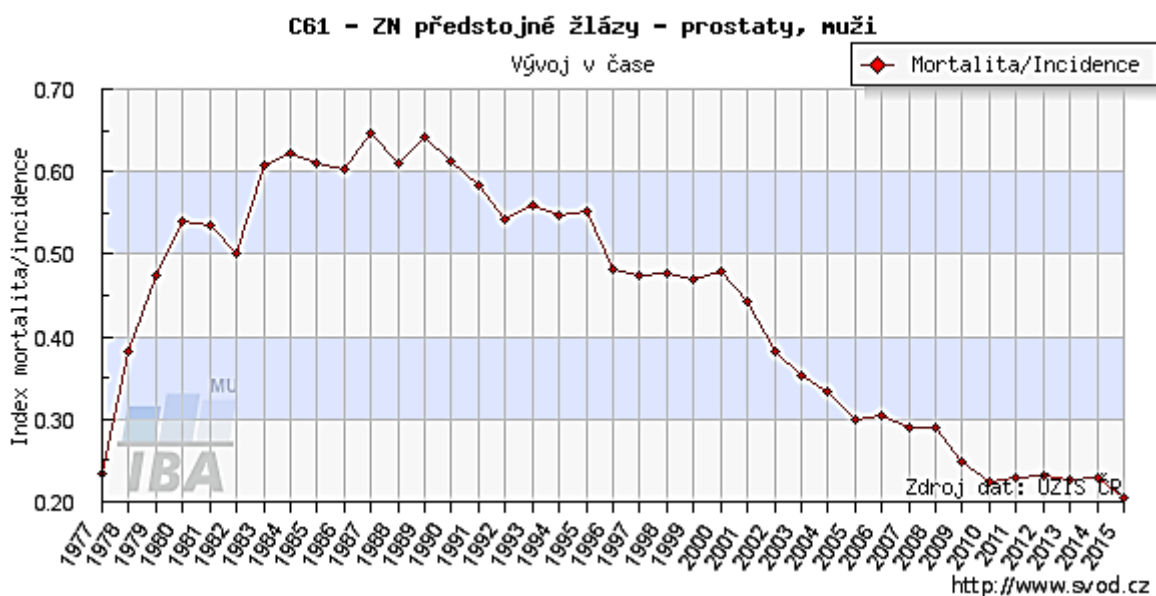
| Bladder - Estimated incidence, all ages: both sexes |          |         |            |         |                 |  |
|---|----------|---------|------------|---------|-----------------|--|
| POPULATION  | *Quality | Numbers | Crude Rate | ASR (W) | Cumulative risk |  |
| Belgium   | A2       | 4350    | 40.3       | 17.5    | 2.10            |  |
| Malta   | A1       | 132     | 31.5       | 15.8    | 1.86            |  |
| Denmark   | A2       | 1781    | 31.8       | 14.4    | 1.75            |  |
| Hungary   | G1       | 2689    | 27.0       | 14.1    | 1.74            |  |
| Spain   | B2       | 13789   | 29.5       | 13.9    | 1.64            |  |
| Norway  | A2       | 1378    | 27.8       | 13.5    | 1.59            |  |
| Germany   | B2       | 28405   | 34.6       | 13.4    | 1.59            |  |
| Switzerland   | B2       | 2115    | 27.3       | 12.2    | 1.49            |  |
| Portugal  | C3       | 2876    | 26.9       | 12.0    | 1.40            |  |
| Italy   | B2       | 18284   | 30.0       | 11.8    | 1.41            |  |
| Cyprus  | A3       | 227     | 20.1       | 11.6    | 1.20            |  |
| Czech Republic                                      | A2       | 2462    | 23.3       | 11.5    | 1.42            |  |
| Iceland   | A1       | 67      | 20.4       | 11.5    | 1.31            |  |
| FYR Macedonia                                       | G3       | 373     | 18.0       | 11.5    | 1.51            |  |
| Austria   | A2       | 2159    | 25.6       | 11.4    | 1.36            |  |
| Poland  | C3       | 7961    | 20.8       | 11.0    | 1.34            |  |
| Bulgaria  | A2       | 1662    | 22.5       | 11.0    | 1.36            |  |
| Croatia   | A2       | 1053    | 24.0       | 10.9    | 1.31            |  |
| Slovenia  | A1       | 463     | 22.7       | 10.7    | 1.33            |  |
| Serbia  | B2       | 1839    | 18.7       | 10.6    | 1.32            |  |
| Sweden  | A2       | 2350    | 24.7       | 10.3    | 1.25            |  |
| Montenegro  | G6       | 96      | 15.2       | 10.1    | 1.24            |  |
| Slovakia  | A1       | 933     | 17.0       | 10.1    | 1.22            |  |
| Albania   | G3       | 420     | 13.0       | 10.0    | 1.27            |  |
| Romania   | E1       | 3825    | 17.9       | 9.7     | 1.23            |  |
| Latvia  | A1       | 425     | 19.0       | 9.2     | 1.10            |  |
| Greece  | G3       | 2777    | 24.3       | 9.1     | 0.95            |  |
| Ireland   | A1       | 666     | 14.5       | 8.9     | 1.05            |  |
| Lithuania   | A1       | 569     | 17.3       | 8.7     | 1.04            |  |
| Luxembourg  | D2       | 96      | 18.3       | 8.7     | 0.94            |  |

Zásadní je ovšem hodnocení poměru incidence a mortality. Ve srovnání s jinými nádory močopohlavního traktu je tento poměr vůbec nejvyšší (NMM 0,41; karcinom prostaty 0,2; karcinom ledviny 0,39; nádory varlat 0,07) (5). Při pohledu na trend posledních let je zřejmé, že na rozdíl od karcinomu ledviny a prostaty je poměr incidence/mortalita u NMM setrvalý, respektive mírně narůstající (Graf 4, 5, 6) (6). Prevalence NMM je vzhledem k vysoké četnosti recidiv a dlouhodobému přežívání pacientů s nádory bez invaze do svaloviny (NMIBC) vysoká. Globálně zaujímá 5. příčku mezi ostatními malignitami a trend je narůstající se všemi sociálně ekonomickými důsledky vzhledem k nutnosti celoživotního sledování a léčby v případě recidivy nádoru (1) (Tab. 2, Graf 7).

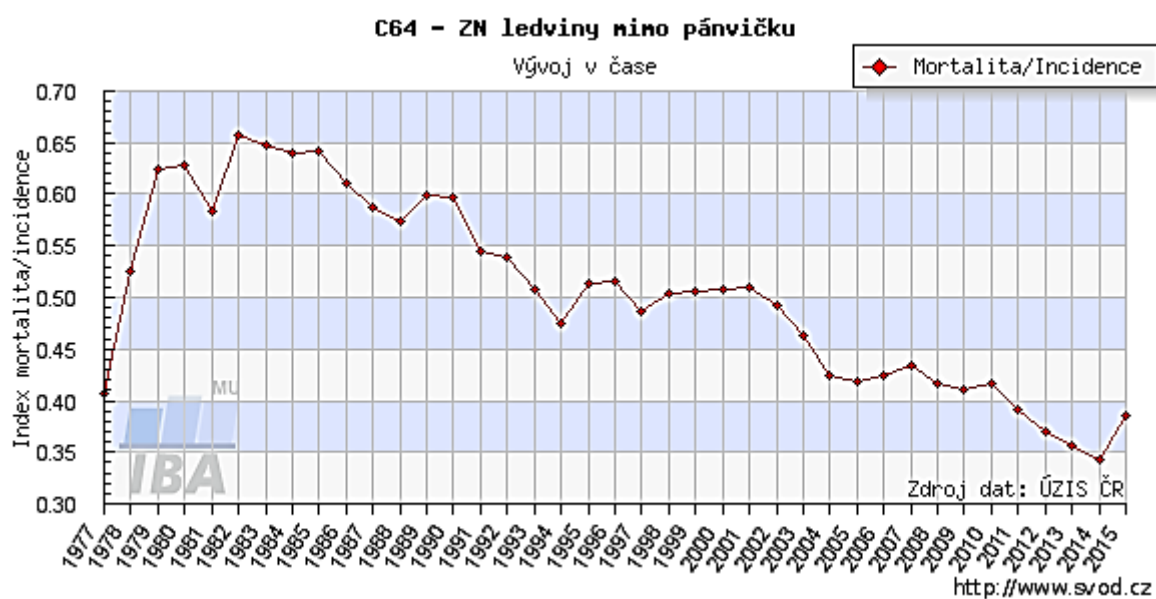
**Graf 4. Vývoj indexu incidence/mortalita u NMM (převzato z 6).**



Graf 5. Vývoj indexu incidence/mortalita u karcinomu prostaty (převzato z 6).



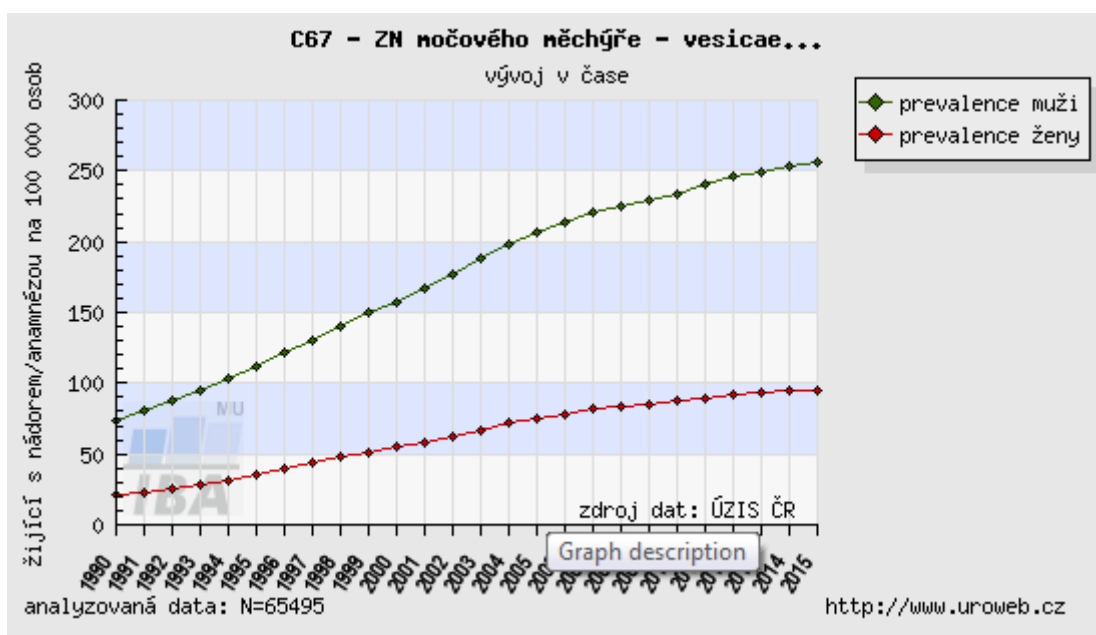
Graf 6. Vývoj indexu incidence/mortalita u karcinomu ledviny (převzato z 6).



**Tab. 2. Top 10 prevalence maligních onemocnění ve světě v roce 2012 (absolutní počty) (převzato z 1).**

| Estimated number of prevalence cases (1-year), males, worldwide (top 10 cancer sites) in 2012 |           |
|---|-----------|
| Cancer  | Value     |
| Prostate  | 975 346   |
| Colorectum  | 528 189   |
| Lung  | 476 240   |
| Stomach   | 303 900   |
| Bladder   | 256 474   |
| Liver   | 161 034   |
| Kidney  | 142 927   |
| Lip, oral cavity  | 134 777   |
| NHL   | 123 936   |
| Oesophagus  | 123 677   |
| All cancers excluding non-melanoma skin   | 4 271 899 |

**Graf 7. Vývoj prevalence NMM v České republice (převzato z 5).**



## 1.2 Etiologie

NMM je komplexní onemocnění, k jehož vzniku přispívají vrozené i zevní faktory (prostředí) způsobující změny na molekulární úrovni. Některé mapovací studie odhalily nezávislé genové lokace, které jsou vnímavé ke

změnám vedoucím ke vzniku NMM (7). Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro NMM je kouření tabáku, které je příčinou více než poloviny případů u mužů a téměř třetiny případů u žen (8). Riziko stoupá úměrně s počtem vykouřených cigaret za den a s celkovou dobou kouření a klesá zhruba o 40 % u exkuřáků po prvním roce a o 60 % po 25 letech od zanechání kouření (9). Navíc se zdá, že kouření tabáku má vliv i na přežívání bez recidivy (10). Doporučení zanechat kouření má tedy kromě prevence vzniku jiných malignit význam také u pacientů s již diagnostikovaným a léčeným NMM.

Muži mají zhruba 4násobně vyšší riziko NMM než ženy (11), nicméně u žen bývají nádory častěji diagnostikovány ve vyšších stádiích a ženy mají také kratší přežívání bez recidivy a progresu, ať už po BCG instilacích (12) nebo po radikální cystektomii (13). Rozdíly mohou být způsobeny hormonálními vlivy (14), delší dobou do stanovení diagnózy (menses, častější výskyt hemoragické cystitidy apod.) (15) anebo vyšší expozicí kancerogenům u mužů. Profesionální expozice aromatickým aminům, polycyklickým aromatickým uhlovodíkům a chlorovaným uhlovodíkům v zaměstnání je totiž po kouření tabáku druhým nejčastějším rizikovým faktorem pro NMM zodpovídajícím za zhruba 10 % případů (16). V rozvinutých zemích lze preventivními opatřeními tato rizika neutralizovat, pozornost je však třeba věnovat rozvojovým zemím, kde zároveň narůstá prevalence kuřáctví (2).

Zevní ozáření pánve zvyšuje riziko sekundárních malignit včetně NMM, stejně jako chronické infekce bilharzií mohou vést k dlaždicobuněčnému karcinomu močového měchýře (17, 18). Onemocnění je věkově specifické. Ačkoliv onemocnění může postihnout i mladší osoby, více než 90 % nových pacientů je starších 50 let (19).

### 1.3 Patologie a stádia onemocnění

NMM je velmi heterogenní onemocnění. Dominujícím histologickým typem nádoru je uroteliální karcinom (UK) vycházející z přechodného epitelu močového měchýře (20). Další méně časté histologické varianty UK jsou např. mikropapilární varianta, mikrocystická varianta a tzv. nested varianta, které mají výrazně horší prognózu a vyžadují agresivnější léčebný přístup i v nižších stádiích (21).

Zhruba 75 % nově diagnostikovaných nádorů jsou svalovinu neinfiltrující formy (NMIBC). Tvoří je Ta a T1 nádory a carcinoma in situ (CIS) (22). Nejfrekventovanější z nich jsou nádory Ta zaujímající cca 70 % NMIBC (2). Nádory T1 představují 20 %, CIS 10 % a přítomnost těchto nádorů zvyšuje riziko recidivy a progresu (23). U více než 80 % pacientů s NMIBC dochází k recidivě a v 15 % případů je recidiva invazivní formou nádoru (24). Dlouhodobé přežívání pacientů s těmito nádory je kolem 90 % (25). Pokud nádor začne infiltrovat svalovinu, velmi záhy může metastazovat a dlouhodobá prognóza nemocných se rychle zhoršuje. Asi 25 % nově diagnostikovaných nádorů je svalovinu infiltrujících vyžadujících radikální cystektomii nebo komplexní onkologickou léčbu. Zhruba u 31 % nemocných se po radikální cystektomii detekují lokální uzlinové metastázy, což významně limituje nádorově specifické přežití (26, 27). Téměř všichni nemocní, kteří zemřou na karcinom močového měchýře, se prezentují vytvořenými metastázami. To je hlavní a zásadní důvod nutnosti časně detekce nádoru ve svalovinu neinfiltrující formě.

TNM klasifikace nádorů močového měchýře z roku 2009 (22) byla aktualizována v roce 2016 bez zásadnějších úprav (Tab. 3). Co se týká buněčné diference UK, původní histopatologická klasifikace WHO z roku 1973 byla přepracována v roce 2004 (28) (Tab. 4, Obr. 1). Tato reklasifikace nabízí jinou stratifikaci pacientů a určité zjednodušení, nicméně nebyla zatím převzata do současných prognostických modelů. Dle doporučení EAU by se

měly užívat obě klasifikace minimálně do doby, než budou dostupná dlouhodobá individuální data pacientů se současným použitím obou klasifikací (29). V roce 2016 byla dokonce publikována aktualizace klasifikace WHO, avšak většina studií a doporučení EAU vychází z dvou předchozích klasifikací (30, 31).

**Tab. 4 Srovnání klasifikací diferenciacce uroteliálního karcinomu WHO 1973 a 2004 (převzato z 28).**

**1973 WHO grading**

Grade 1: well differentiated

Grade 2: moderately differentiated

Grade 3: poorly differentiated

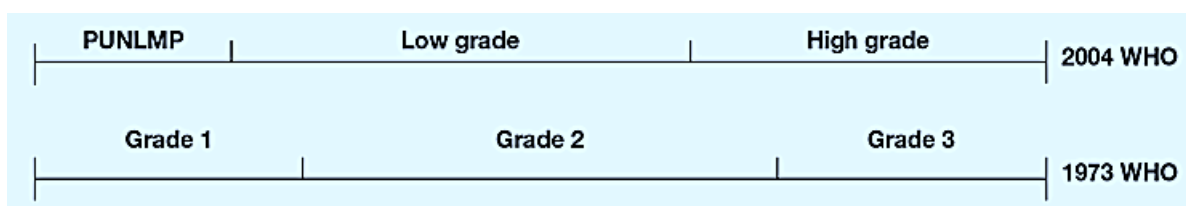
**2004 WHO grading system (papillary lesions)**

Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (PUNLMP)

Low-grade (LG) papillary urothelial carcinoma

High-grade (HG) papillary urothelial carcinoma

**Obr. 1 Porovnání stratifikace pacientů s použitím klasifikací WHO 1973 a 2004 (převzato z 32).**



**Tab.3 TNM klasifikace nádorů močového měchýře (22).**

|   |
|---|
| <b>T – Primární nádor</b>                         |
| TX primární nádor nelze zhodnotit                 |
| T0 bez primárního nádoru                          |
| Ta neinvazivní papilární karcinom                 |
| CIS karcinom in situ (plochá high grade léze)     |
| T1 tumor infiltruje subepiteliální pojivovou tkáň |



|   |
|---|
| <p>T2 tumor infiltruje svalovinu detruzoru</p> <p>T2a tumor infiltruje svalovinu povrchově (vnitřní polovinu)</p> <p>T2b tumor infiltruje svalovinu do hloubky (zevní polovinu)</p> <p>T3 tumor infiltruje perivezikální tkáň</p> <p>T3a mikroskopicky</p> <p>T3b makroskopicky (extravezikální masa)</p> <p>T4 tumor infiltruje cokoli z následujícího: stroma prostaty, semenné vajíčky, děloha, pochva, stěna pánve, stěna břicha</p> <p>T4a tumor infiltruje stroma prostaty, semenné vajíčky, dělohu či pochvu</p> <p>T4b tumor infiltruje stěnu pánve nebo stěnu břicha</p> |
| <p><b>N – Regionální mízní uzliny</b></p>   |
| <p>NX regionální mízní uzliny nelze zhodnotit</p> <p>N0 bez metastáz v mízních regionálních uzlinách</p> <p>N1 metastáza v jediné mízní uzlině v malé pánvi (hypogastrické, obturatorní, zevní ilické nebo presakrální uzliny)</p> <p>N2 vícečetné metastázy v malé pánvi (hypogastrické, obturatorní, zevní ilické nebo presakrální uzliny)</p> <p>N3 metastázy(a) ve společných(é) ilických(é) uzlinách(ě)</p>  |
| <p><b>M – Vzdálené metastázy</b></p>  |
| <p>M0 bez vzdálených metastáz</p> <p>M1 extraregionální mízní uzliny</p> <p>M2 jiné vzdálené metastázy</p>  |

#### 1.4 Prognostické faktory

Správná léčba je založena na co nejpřesnější prognóze. Riziko recidivy a progresu UK se liší podle přítomných klinických a histopatologických parametrů. Subklasifikace nádorů T1 dle hloubky a rozsahu invaze do subepiteliální vrstvy má svou klinickou hodnotu, nicméně optimální systém klasifikace zatím nebyl definován (33, 34). Dle systematického review a

metaanalýzy je lymfovaskulární invaze ve vzorku z transuretrální resekce (TUR) silným prognostickým faktorem recidivy a progresu u NMIBC (35). EORTC v roce 2006 vytvořila tabulky rizik progresu a recidivy na základě skórovacího systému, který byl kalkulován z dat 2596 pacientů léčených a sledovaných pro NMIBC a randomizovaných do 7 prospektivních studií (36). Pacienti se samostatným CIS nebyly do studií zahrnuti. Skórovací systém je založen na šesti nejvýznamnějších klinických a histopatologických parametrech, jimž jsou u konkrétního pacienta přiřazeny body a součet těchto bodů tvoří výsledné skóre. Toto skóre se počítá zvlášť pro recidivu a progresi a dle jeho hodnoty systém kalkuluje riziko recidivy a progresu během jednoho a pěti let sledování. Signifikantní vliv na vznik recidivy a progresu mají tyto faktory: počet nádorů v měchýři, velikost nádorů, četnost předchozích recidiv, stádium onemocnění, přítomnost CIS a diferenciace nádoru (Tab. 5, 6). Na základě těchto dat a dalších prognostických faktorů (přítomnost CIS v prostatické uretře, přítomnost high grade (HG) nádoru v časném re-TUR, rychlá recidiva 3 měsíce od TUR atd.) doporučil panel EAU pro NMIBC rozdělení pacientů do rizikových skupin, což by mělo vést k rychlejšímu a jednoduššímu rozhodování o léčebné strategii v běžné klinické praxi (Tab. 7).

Na základě klinických dat 5122 pacientů s nádory Ta/T1 a mediánem sledování 62 měsíců bylo zjištěno, že rozdělení do rizikových skupin dle EAU doporučení v porovnání se stratifikací dle EORTC reklasifikovalo 37,9 % pacientů do vyššího rizika recidivy a 11,8 % pacientů do vyššího rizika progresu. Tato reklasifikace však ve většině případů neměla vliv na další léčebný postup a stratifikace dle EAU může být tedy považována za alternativní nástroj ke stanovení rizik (37).

**Tab. 5. Skórovací systém přiřazující body u konkrétního pacienta dle šesti klinických a histopatologických parametrů (převzato z 36).**

| <b>Factor</b>                | <b>Recurrence</b> | <b>Progression</b> |
|------------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>Number of tumours</b>     |                   |                    |
| Single                       | 0                 | 0                  |
| 2-7                          | 3                 | 3                  |
| ≥ 8                          | 6                 | 3                  |
| <b>Tumour diameter</b>       |                   |                    |
| < 3 cm                       | 0                 | 0                  |
| ≥ 3                          | 3                 | 3                  |
| <b>Prior recurrence rate</b> |                   |                    |
| Primary                      | 0                 | 0                  |
| ≤ 1 recurrence/year          | 2                 | 2                  |
| > 1 recurrence/year          | 4                 | 2                  |
| <b>Category</b>              |                   |                    |
| Ta                           | 0                 | 0                  |
| T1                           | 1                 | 4                  |
| <b>Concurrent CIS</b>        |                   |                    |
| No                           | 0                 | 0                  |
| Yes                          | 1                 | 6                  |
| <b>Grade</b>                 |                   |                    |
| G1                           | 0                 | 0                  |
| G2                           | 1                 | 0                  |
| G3                           | 2                 | 5                  |
| <b>Total Score</b>           | <b>0-17</b>       | <b>0-23</b>        |

**Tab. 6. Rizika recidivy a progresu dle výsledného skóre (převzato z 36).**

| Recurrence score  | Probability of recurrence at 1 year  |           | Probability of recurrence at 5 years  |          |
|-------------------|--------------------------------------|-----------|---------------------------------------|----------|
|                   | %                                    | (95% CI)  | %                                     | (95% CI) |
| 0                 | 15                                   | (10-19)   | 31                                    | (24-37)  |
| 1-4               | 24                                   | (21-26)   | 46                                    | (42-49)  |
| 5-9               | 38                                   | (35-41)   | 62                                    | (58-65)  |
| 10-17             | 61                                   | (55-67)   | 78                                    | (73-84)  |
| Progression score | Probability of progression at 1 year |           | Probability of progression at 5 years |          |
|                   | %                                    | (95% CI)  | %                                     | (95% CI) |
| 0                 | 0.2                                  | (0-0.7)   | 0.8                                   | (0-1.7)  |
| 2-6               | 1                                    | (0.4-1.6) | 6                                     | (5-8)    |
| 7-13              | 5                                    | (4-7)     | 17                                    | (14-20)  |
| 14-23             | 17                                   | (10-24)   | 45                                    | (35-55)  |

**Tab. 7. Rozdělení NMIBC do rizikových skupin dle doporučení panelu EAU pro NMIBC (převzato z 29).**

| Rozdělení dle rizikových skupin | Charakteristika nádorů  |
|---------------------------------|---|
| Nádory s nízkým rizikem         | Primární, solitární, TaG1 (PUNLMP, LG*), < 3 cm, bez CIS  |
| Nádory se středním rizikem      | Všechny nádory nespádající do ostatních dvou kategorií  |
| Nádory s vysokým rizikem        | Cokoli z následujícího:<br>- T1 nádor<br>- G3 (HG**) nádor<br>- karcinoma in situ (CIS)<br>- mnohočetné, recidivující a velké ( $\geq 3$ cm) nádory Ta G1+G2/LG (všechny znaky musí být přítomny) |
|                                 | <b>Skupina s velmi vysokým rizikem</b>  |

|  |  |
|--|--|
|  | T1 G3/HG nádory s konkomitantním CIS, mnohočetné a/nebo velké T1 G3/HG a/nebo recidivující T1G3/HG, T1G3/HG s CIS v prostatické uretře, některé histologické varianty uroteliálního karcinomu, lymfovaskulární invaze. |
|--|--|

\* LG nádory zahrnují nádory G1 a některé nádory G2

\*\* HG nádory zahrnují některé nádory G2 a nádory G3

## 1.5 Léčba

Základem léčby NMM je TUR. Cílem kvalitní TUR je:

1. kompletní odstranění nádoru z močového měchýře;
2. stanovení přesného stádia onemocnění, což umožní zvolit správnou léčebnou strategii.

Kvalita TUR má tedy zásadní vliv na prognózu onemocnění. Je odlišná na různých pracovištích a je třeba se jí věnovat ve formě výukových programů a školení pro rezidenty (38, 39). Přítomnost svaloviny detruzoru v resektátu je důležitým prognostickým faktorem pro vznik časně recidivy nádoru (40). Absence detruzoru, jakýkoli nádor T1 a nekompletní primární resekce jsou indikacemi k časně „restagingové“ TUR, kterou je třeba provést 2-6 týdnů po primární resekcii (29).

Adjuvantní léčba ve formě intravezikální chemoterapie využívá nejčastěji Mitomycin C a Epirubicin a její cíl je prevence recidivy onemocnění. Jednorázová instilace („single shot“) bezprostředně po resekcii nádoru je dostatečnou adjuvantní léčbou u pacientů s nádory s nízkým rizikem a některých pacientů s nádory se středním rizikem dle EAU (41). Jednorázová instilace u pacientů v průběhu 5 let sledování snížila míru recidivy o 14 %.

U pacientů se středním a vysokým rizikem je nutné podávat opakované ambulantní instilace v různých schématech (42) a v recentně publikované prospektivní randomizované studii bylo prokázáno, že i u takových pacientů má význam jednorázová instilace (43). U těchto rizikových skupin pacientů je v prevenci recidivy efektivnější BCG intravezikální imunoterapie, která by měla pokračovat v rámci udržovací léčby až do doby 1 – 3 roky od TUR (44, 29). V některých studiích byl demonstrován také vliv BCG léčby na snížení rizika progresu (45) a její benefit je evidentní zejména při léčbě CIS močového měchýře (46).

U pacientů s velmi vysokým rizikem nebo u těch, kteří recidivují po BCG instilacích je metodou volby radikální cystektomie (29). Radikální operace ve formě cystektomie se standardní nebo rozšířenou pánevní lymfadenektomií je pilířem léčby svalovinu infiltrujících forem nádoru (MIBC) (47). Vzhledem k tomu, že (v závislosti na stádiu onemocnění) je 5leté nádorově specifické přežití zhruba 66 %, je u pacientů s MIBC bez postižení uzlin (cN0) a bez metastáz doporučena neoadjuvantní chemoterapie na bázi cis-platiny (48, 49). 5leté nádorově specifické přežití lze takto zlepšit až o 8 % a to dokonce více u vyšších klinických stádií (50), kde lze prokázat signifikantní snížení stádia onemocnění (51). Adjuvantní chemoterapie je doporučena u stádií pT3-4 a/nebo pN+, pokud nebyla podána neoadjuvatní chemoterapie (47), avšak dle našich zkušeností lze s chemoterapií pokračovat i v těchto případech, popřípadě s odlišnou kombinací. Nemocným, kteří jsou neúnosní cystektomie nebo tuto operaci odmítají, lze nabídnout „měchýř šetřící“ alternativu. V současné době je metodou volby trimodální léčba, tedy maximální TUR a radioterapie s konkomitantní chemoterapií. V publikovaných souborech jsou data srovnávající 5leté nádorově specifické přežití podobná datům po cystektomii, nicméně se jedná o selektované soubory pacientů (52, 53).

Léčba generalizovaného onemocnění je pouze paliativní s průměrným přežíváním 12,5 – 14,8 měsíců (54). Metodou první volby je chemoterapie první linie a při jejím selhání chemoterapie druhé linie (47). V poslední době se dostává do popředí role imunoterapie, a to tzv. „check point“ inhibitory, konkrétně proteinů PD-1, PD-L1 a CTLA-4.

V první linii léčby pacientů s lokálně pokročilým a metastatickým karcinomem neúnosných systémové chemoterapie na bázi cis-platiny byl FDA a EMA schválen v roce 2017 pembrozilumab a atezolizumab (55, 56). Celková léčebná odpověď byla pozorována u 29 % pacientů u obou preparátů. Další indikací jsou nemocní progredující po první linii chemoterapie s cis-platinou. Již v květnu 2016 byl FDA v této indikaci schválen atezolizumab na základě výsledků studie druhé fáze (57). Při srovnání celkového přežití mezi atezolizumabem a chemoterapií druhé linie (vinflunin, docetaxel nebo paclitaxel) nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly při lepším bezpečnostním profilu imunoterapie a byly potvrzeny dlouhodobé léčebné odpovědi atezolizumabu zjištěné ve druhé fázi studie (58). Pembrozilumab byl schválen FDA v roce 2017 na základě dat studie fáze III, kdy bylo jeho podání spojeno s delším celkovým přežíváním (komparátorem byla opět chemoterapie 2. linie) (10,3 versus 7,4 měsíců,  $p = 0,002$ ), navíc bez závislosti na stupni exprese PD-L1 (59). Dalším inhibitorem schváleným v Evropě na základě dlouhodobých léčebných odpovědí ve studii fáze 2 je nivolumab (60).

## 2. Neinvazivní diagnostika

### 2.1 Úvod

Biomarkery se v poslední době dostaly do popředí zájmu zejména jako doplňkové vyšetření při sledování nemocných s anamnézou karcinomu močového měchýře k časně detekci recidivy onemocnění a ve skríningu. Vzhledem k tomu, že urotel i případný nádor jsou v přímém kontaktu s močí, je středem pozornosti vytvoření testu, jenž by byl schopen zachytit nebo vyloučit nádor močového měchýře na základě pouhého vyšetření moči, určit prognózu onemocnění (např. stanovit riziko recidivy při dispenzarizaci) nebo predikovat odpověď na podanou léčbu. Obecně podává informace o fyziologických nebo patologických procesech v organismu.

Dobrý biomarker k užití v klinické praxi byl definován jako spolehlivý, dobře měřitelný a interpretovatelný marker, který se vyznačuje dobrou senzitivitou a specificitou. Jinými slovy jej lze charakterizovat jako „jednodušší, efektivnější, rychlejší a levnější“ než současný standard (61). Jednoduchost provedení a tedy dostupnost stejně jako cena záleží na použité metodologii. „Efektivnější“ je nejdůležitější charakteristika testu odkazující na jeho diagnostický potenciál, tedy senzitivitu a specificitu. Rychlost je podstatná pro klinickou praxi v kontextu s významem informace, kterou nám test podává v určité klinické situaci. Každý biomarker má své specifické vlastnosti a bohužel žádný není ideální.

Biologické markery se dělí podle svého účelu na diagnostické, prognostické a prediktivní. Další dělení může být na markery rozpustné v moči a markery založené na buňkách (tzn. buňkách a jejich antigenech přítomných v moči) (62). Diagnostické markery jsou ty markery, které poskytují informaci o přítomnosti či nepřítomnosti malignity, ideálně ještě před její klinickou



manifestací. Jsou užívané ke skríningu a k dispenzarizaci, v urologii např. rutinně užívané u karcinomu prostaty (PSA).

Prognostické markery predikují onkologický a klinický výsledek léčby nemocného, tedy celkové přežití a přežití bez recidivy onemocnění. Tyto markery mohou pomoci při rozhodování o terapeutickém postupu u konkrétního nemocného, tedy volby agresivnějšího či méně agresivního postupu (63). V souvislosti s nádory močového měchýře se jedná zejména o markery stanovené z histologického vyšetření preparátu, ale také například detekce molekulárních změn v buňkách získaných z moči při negativním cystoskopickém nález, které předpovídají vznik recidivy v rámci sledování. Prediktivní markery specificky rozhodují o konkrétním postupu u konkrétního nemocného, tzn. predikují odpověď na určitou léčbu. Příkladem je genetický skrínig na přítomnost K-ras mutací u nemocných s kolorektálním karcinomem, který identifikuje nemocné profitující z léčby cetuximibem (64).

Na rozdíl od gradingu a stagingu malignity mohou biomarkery do určité míry reflektovat značnou molekulární diverzitu jednotlivých nádorů, protože speciálně uroteliální karcinomy mají velmi heterogenní průběh. Rozhodující pro volbu testu nebo biomarkeru je určení klinické situace, ve kterých plánujeme jeho využití. V kontextu UK močového měchýře a diagnostických markerů, které jsou předmětem této práce, je to: skrínig, dispenzarizace nádorů s vysokým rizikem, dispenzarizace nádorů s nízkým/středním rizikem a tzv. reflexní testování.

### *Skrínig*

Skrínig je použití diagnostických testů k vyhledávání rizikových nebo nemocných osob v exponované populaci zdánlivě zdravých osob bez příznaků daného onemocnění. Cílem je časný záchyt onemocnění a z toho resultující snížení mortality a zlepšení kvality života. Předpokladem

skríníngu je dostatečná prevalence onemocnění a existence diagnostického testu, který je levný, co nejméně invazivní, a který má dostatečnou senzitivitu a zejména specifitu. V případě karcinomu močového měchýře zatím takový test bohužel nebyl nalezen.

Problémem je relativně nízká prevalence v běžné populaci a také vysoké zastoupení nízkých stádií onemocnění s malým vlivem na mortalitu onemocnění. Řešením by mohlo být definování rizikových populací pacientů, u kterých je riziko přítomnosti karcinomu vyšší, jako jsou pacienti s hematurii, symptomy dolních močových cest nebo pacienti dlouhodobě vystavení působení tabákového kouře, ev. účinkům průmyslových chemikálií (65). Například u nemocných s mikrohematurii nebo makrohematurii je pravděpodobnost přítomnosti karcinomu měchýře 5 %, respektive 27 % (66).

Několik studií se zabývalo skríníngem zdravých pacientů s mikrohematurii (67), testováním letitých kuřáků a lidí s profesionální expozicí kancerogenním látkám (65) nebo sledováním pacientů s intersticiální renální fibrózou (aristocholic acid nefropatie) (68). I když skríníng v některých případech pozitivně ovlivnil časnou detekci nádoru močového měchýře a mohl snížit celkovou mortalitu, největším problémem stále zůstává, jak přesně definovat rizikovou populaci, která by měla být skrínována. Řešením by do budoucna mohlo být vytvoření a validace kalkulátoru rizik („risk-adapted screening“), který by tyto populace skóroval (věk, pohlaví, počet cigaret = pack-year apod.) a tím objektivizoval.

### *Dispenzarizace pacientů s nádory o vysokém riziku*

Sledování pacientů s UK o vysokém riziku je jednou z klíčových oblastí v použití nových onkomarkerů. Vzhledem k vysoké četnosti recidiv se jedná o populaci pacientů s vysokou incidencí nádoru a proto markery vykazují vysoké pozitivní prediktivní hodnoty. Problém je v definici negativního testu, protože některé testy mohou být pozitivní i při negativním nálezu v měchýři, což může vyjadřovat změny na molekulární úrovni a tím predikovat recidivu (69). Dobrá senzitivita je extrémně důležitá při sledování těchto forem nádorů, i za cenu nižší specificity. Cytologie je v tomto ohledu efektivní (70), nicméně některé markery vykazují ještě vyšší senzitivitu (viz dále). Prospektivní studie však schází, tudíž zatím není jejich rutinní využití v běžné klinické praxi opodstatněné.

### *Dispenzarizace pacientů s nádory o středním/nízkém riziku*

U těchto nádorů je riziko progresu nízké, přehlédnutí takového nádoru během dispenzarizace tedy nezpůsobí závažný klinický problém (36). Spolehlivý neinvazivní marker s dobrou specificitou, resp. negativní prediktivní hodnotou, může snížit počet cystoskopií v průběhu sledování. Zároveň je potřeba, aby byl marker schopen detekovat významné množství těchto nádorů, což cytologie moči v tomto případě nesplňuje (viz dále) (71). V prospektivní multicentrické studii s 448 pacienty (nádory Ta, T1, G1 a G2) sledovanými pomocí analýzy mikrosatelitů zlepšila znalost pozitivního výsledku počty zachycených nádorů při cystoskopii (72). Tento výsledek podporuje použití některých markerů jako součást endoskopické dispenzarizace nemocných s těmito nádory.

### *Reflexní testování*

Při reflexním testování jsou pomocí nových markerů testovány takové nálezy, které jsou sice suspektní, nicméně nejednoznačné při použití jiných

markerů (např. PAP 3 v cytologii moči). Tento přístup se zdá být logický, avšak k jednoznačnému závěru a doporučení máme k dispozici příliš málo kvalitních dat (73, 74).

## **2.2 Přehled dostupných markerů**

Stále nemáme k dispozici ideální test nebo vyšetření, které by měly dostatečnou senzitivitu (cytologie), specifitu (mikrohematurie) nebo nízkou invazivitu (endoskopie). Některé „nové“ biomarkery se již komerčně vyrábějí (např. BTA Stat, NMP22, UroVysion FISH, ImmunoCyt – viz dále). Většina těchto testů vykazuje senzitivitu 80 % - 92 % pro HG tumory. Kombinací s jinými vyšetřeními, např. cytologií, lze zvýšit senzitivitu i u více diferencovaných tumorů, leckdy ovšem na úkor snížení specifity (75). V popředí zájmu jsou také genetické markery, které by bylo možno získat z moči. Velmi pravděpodobně má budoucnost kombinace těchto testů. Následuje souhrn informací o běžně používaných testech a nových či staronových markerech. Stále ovšem platí, že žádný z nich (kromě cytologie moči a mikrohematurie) není dosud součástí obecných doporučení z toho důvodu, že jejich použití zatím nemá zásadní vliv na klinické rozhodování u jednotlivého pacienta. Základními důvody jsou absence standardizovaných laboratorních metod a klinické validace výsledků na heterogenních populacích pacientů (76). Problémem je i samotná interpretace dat získaných z dostupných studií pro jednotlivé markery. Studie mají různou kvalitu, design, selekci pacientů, různá stadia onemocnění, rozdílné prevalence nádorů v kohortách a primární cíle, což vše znemožňuje provedení kvalitních metaanalýz. Markery UK močového měchýře lze obecně rozdělit na močové (derivované z moči) a buněčné.

## ***Cytologie moči a testování na mikrohematurii***

Testování mikrohematurie a cytologie moči jsou nadále základním a široce užívaným prostředkem k detekci uroteliálního karcinomu. Cystoskopie s následným histologickým vyšetřením bioptických vzorků jsou zlatým standardem pro stanovení diagnózy.

### *Testování mikrohematurie*

Stanovení přítomnosti červených krvinek u spontánně vymočené moči je základním screeningovým vyšetřením pro urologické malignity, a zejména UK močového měchýře. Téměř 85 % pacientů s UK má mikroskopickou nebo makroskopickou hematurii (77).

Mikrohematurie je definována jako > 3 erytrocyty na zorné pole z dvou až tří močových sedimentů. Chemický test na hemoglobin je velmi rychlá a levná metoda k detekci mikrohematurie. Prevalence UK u lidí s mikroskopickou hematurii je obecně nízká (78). Pozitivní prediktivní hodnota mikrohematurie je pouze zhruba 8 % (79). Příčinou je fakt, že se mikrohematurie může vyskytnout u četných benigních urologických onemocnění, zejména zánětů, litiázy nebo benigní hyperplazie prostaty. Senzitivita testu na mikrohematurii je zhruba 47-95 % (80), ke zvýšení senzitivity může přispět opakované vyšetření (81).

### *Cytologie moči*

Cytologie nádorových buněk ve spontánně vymočené moči nebo výplachová cytologie je široce používaná neinvazivní metoda a v současné době stále představuje zlatý standard v diagnostice a dispenzarizaci UK močového měchýře. Pozitivní cytologické vyšetření poukazuje pouze na přítomnost nádoru v urologickém traktu, protože nádor může být lokalizován v uretře, močovém měchýři, ale i v horních močových cestách. Používá se jako

doplňek cystoskopie, vyznačuje se vysokou specificitou, ale relativně nízkou senzitivitou, zejména u dobře diferencovaných nádorů (82). Naopak u CIS a špatně diferencovaných nádorů je senzitivita 75 – 95 % (83). Přehled výsledků největších metaanalýz je uveden v Tab. 9.

**Tab. 9. Přehled senzitivity a specificity cytologie moči; výsledky metaanalýz.**

| Počet pacientů | Medián senzitivity (95% CI) | Medián specificity (95% CI) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 3,444 (84)     | 55 (48 – 62)                | 94 (90 – 96)                |
| 2,767 (85)     | 34 (20 – 53)                | 99 (83 – 99)                |
| 5,545 (86)     | 35 (13 – 75)                | 94 (85 – 100)               |
| 14,260 (87)    | 44 (38 – 51)                | 96 (94 – 98)                |

Nízkou senzitivitu cytologie lze vysvětlit např. malým objemem moči – a tedy malým množstvím buněk, který je analyzován, nebo nadbytkem jiných nenádorových buněk, které znesnadňují vyšetření (88). Za adekvátní odběr lze považovat množství 30-50 ml, větší objem způsobuje již pouze nelineární nárůst zachytu buněk s HG dysplázií (89). Další limitací cytologie moči je zkušenost patologa a rozdíl v interpretaci cytologických změn mezi cytopatologi, např. u reaktivních změn urotelu.

Z výše uvedeného vyplývá, že cytologické vyšetření moči nemá ve většině případů uplatnění jako samostatná metoda, nýbrž jako doplněk jiných vyšetření včetně endoskopie anebo ke sledování špatně diferencovaných tumorů. V průběhu doby bylo cytopatologi používáno několik klasifikačních systémů (PAP, Koss, Murphy atd.) z důvodu absence doporučení založeného na důkazech (90). Zejména nadbytek neurčitých (ekvivokálních) cytopatologických diagnóz vedl k poklesu pozitivní prediktivní hodnoty cytologie (např. skupina nálezů PAP 3) (91).

V posledních letech je pozorována snaha o vytvoření standardizovaného systému klasifikace cytologických nálezů (92). Pařížský systém (The Paris System for Reporting Urinary Cytology) je zaměřen na redukci indeferentních cytopatologických diagnóz při zachování dobré efektivity metodologie. Zejména LG dysplázie obsahují atypické buňky, jejichž změny však nejsou zcela diagnostické, a tyto nálezy nejvíce přispívají k tvorbě indeferentních skupin. Systém rozeznává 7 cytopatologických skupin na základě přesně definovaných cytomorfologických změn (negativní pro HG UK, HG UK, podezření na HG UK, atypické uroteliální buňky, LG uroteliální neoplázie, ostatní malignity a nediagnosticské nálezy). Ke každé skupině je na základě dat přiřazeno riziko přítomnosti malignity (93).

V současnosti představuje Pařížský systém nejlepší prostředek ke stratifikaci skupin s atypickými uroteliemi dle rizik pro přítomnost HG dysplázie. I přesto však existují určité kontroverze v přesných definicích jednotlivých skupin a všeobecné přijetí jakýchkoli doporučení mezi cytopatology, které by se bezprostředně promítlo do klinické praxe, schází.

### ***UBC® Rapid***

UBC® Rapid je ambulantně prováděný test vyvinutý k detekci a monitoraci UK močového měchýře. UBC® Rapid je stejně efektivní jako UBC® immunoassay, výhodou je jeho rychlost, jelikož jsou výsledky dostupné během jedné návštěvy pacienta. Test je založen na imunochromatografii, pomocí které detekuje fragmenty cytokeratinu (CK) 8 a 18 v moči. CK jsou intermediární vlákna cytoskeletu a jsou typická pro epiteliální původ buněk. V lidských buňkách bylo identifikováno 20 CK a exprese CK 8, 18, 19 a 20 na úrovni proteinu nebo mRNA byly testovány jako markery UK močového měchýře (94). V dostupných studiích UBC test vykazoval zejména u LG nádorů vyšší senzitivitu než cytologie moči (průměrně 60 %) (95, 96, 97).

V kombinaci s cytologií se senzitivita samotné cytologie zvýšila na úkor snížení specificity (98).

### ***Bladder Tumor Antigen Test (BTA)***

BTA je vyšetření, které měří hladinu proteinu blízkého faktoru H komplementu v moči. Tento protein (protilátka) je do moči secernován ve velkém množství nádorovými buňkami (99). Existují dvě formy vyšetření: BTA stat je standardní imunoesej, kterou se stanovuje přibližná hladina protilátek v ambulantních podmínkách. BTA TRAK je laboratorně prováděná ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Jejich senzitivita je vyšší než u cytologie (17-89 %) a je závislá na gradingu, stádiu a velikosti nádoru (100). U LG tumorů s nízkými stádii se nicméně senzitivita také snižuje (101). Specificita je kolem 90 %, nesprávně pozitivní nálezy narůstají u zánětlivých onemocnění urotraktu a u hematurie (faktor H komplementu je přítomen v krvi) (102). Test je schválen FDA k dispenzarizaci pacientů s UK močového měchýře jako komplement cystoskopie. V systematickém review byl medián senzitivity vyšší pro BTA TRAK než pro BTA stat test (71 vs. 58 %) a naopak, medián specificity vyšší (73 %) pro BTA *stat* než BTA TRAK (66 %) (86).

### ***Nuclear Protein Marker 22 (NMP22)***

NMP 22 je regulátor mitózy buněk a jeho exprese je signifikantně zvýšena u maligních onemocnění. Jeho množství v moči se zvyšuje při apoptóze buněk a může být měřeno kvantitativně imunoesejí (NMP 22 test) nebo ambulantně kvalitativně (NMP BladderChek). Senzitivita tohoto vyšetření je 46-88 % (103). Některé studie prokázaly jeho benefit v kombinaci s cystoskopií (104). Specificita nedosahuje specificity cytologie vzhledem k variabilním cut-off hodnotám při kvantitativním stanovení (105). Podle metaanalýzy má



NMP22 vyšší senzitivitu než cytologie moči (medián 68 %), zejména pro nízké stádia LG onemocnění, ovšem opět za cenu nižší specificity (79 %) (106).

### ***BLCA-4 a BLCA-1***

Jedná se o nukleární proteiny, které byly identifikovány při proteomických analýzách. Test se provádí pomocí ELISA s použitím dvou monoklonálních protilátek. Dle retrospektivních studií případů a kontrol mají vysokou specificitu a senzitivitu (107), nicméně kvalitnější data nejsou k dispozici.

### ***Analýza mikrosatelitů***

Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní krátké repetice DNA. Existují dvě základní mikrosatelitní alterace: ztráta heterozygoty (LOH) a mikrosatelitová instabilita. LOH je často nalezena na 9. chromozomu. Test se provádí DNA analýzou pomocí PCR. Senzitivita je kolem 72-97 % a specificita až 100 % (86). Limitací je drahé vybavení a školený personál (108).

### ***Telomerázy***

Telomerázy jsou ribonukleoproteiny, které připojují telomery (repetitivní sekvence na konci chromozomu zodpovědné za stabilitu genomu) k chromozomům a způsobují tím buněčnou nesmrtelnost. Jsou opět stanovovány pomocí PCR. Senzitivita a specificita jsou 70-90 %, respektive 80-90 %, nicméně specificita je snížena při zánětech (109).

### ***uCyt+ TM /ImmunoCyt TM***

Jedná se o komerčně dostupný imunofluorescenční test, při kterém se používá směs tří protilátek k detekci dvou proteinů podobných mucinu a k detekci vysokomolekulární formy karcinoembryonálního antigenu (110). Tyto molekuly jsou exprimovány na povrchu nádorových uroteliálních buněk v moči. Slouží jako doplněk cytologie a může být prováděn stejným týmem. Senzitivita je kolem 53-100 % a specifita 64-95 % (111). Významným znakem je vysoká senzitivita pro detekci LG nádorů, která byla v průměru 85 %. Celková specifita dosahovala 75 % (111, 112). Nevýhodou je velká závislost na erudici personálu, časová náročnost a minimálně 500 buněk nutných k vyloučení malignity. Navíc použití fluorescence znesnadňuje pozdější cytologické vyšetření. V kombinaci s cytologií zachytí až 100 % CIS, která nejsou detekována endoskopií (113).

### ***UroVysion (Multitarget Fluorescence In Situ Hybridization)***

Test funguje na principu FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Využívá vysoké incidence chromozomálních abnormalit v buňkách uroteliálního karcinomu (102). Četné studie prokázaly, že specifita a senzitivita tohoto testu se blíží specifitě a senzitivě cytologie. Výsledek tohoto vyšetření není ve velké míře ovlivněn zánětlivými procesy. Dokonce se zdá, že dříve proklamované nesprávně pozitivní výsledky jsou ve skutečnosti časně subklinické prekanceromatózní změny (114). Test může mít význam při reflexním testování pacientů s atypickou cytologií ať už v primární diagnostice nebo při dispenzarizaci (115). Je to nicméně drahé vyšetření vyžadující náročnou expertýzu a specializované vybavení.

Všechny výše zmíněné testy (a výčet není zdaleka úplný) byly vyvinuty za účelem zvýšení senzitivity cytologie. Obzvláště užití testů v kombinacích

může být výhodné z hlediska možnosti odložení endoskopie při dispenzarizaci, zejména u neinvazivních tumorů s nízkým gradem a u ekvivokálních výsledků cytologie.

### **2.3 Proteiny buněčného cyklu**

Proteiny buněčného cyklu jsou klíčové regulátory zodpovědné za přenos informací signálními cestami. Například stupeň exprese Mcm2-7 (mini chromosome maintenance) proteinů může být použit ke stanovení stádia buněčného cyklu v lidské tkáni (116). Tyto proteiny hrají podstatnou roli v iniciaci replikace DNA (117). Jsou exprimovány u buněk v proliferační fázi ve všech stádiích buněčného cyklu a naopak u diferencovaných buněk schází. Představují tedy biomarkery růstu (118).

Stupeň exprese Mcm5 proteinu je studován jako diagnostický marker u mnoha malignit včetně karcinomu močového měchýře. Stanovuje se imunochemicky v buňkách získaných z moči (imunocytologie moči). V normálním urotelu jsou exprimovány pouze v oblasti bazální membrány, zatímco u dobře i špatně diferencovaných tumorů jsou exprimovány ve všech vrstvách nádorově transformovaného epitelu (119). Specifita je vyšší než u cytologie a navíc není ovlivněna zánětlivými procesy včetně podání BCG (120).

Výtěžnost MCM proteinů může být umocněna jejich kombinací s jinými klíčovými regulátory buněčného cyklu, jako např. Gemininem nebo mitotickou kinázou Polo-like kináza 1 (Plk 1). Takto je možno získat detailní analýzu kinetiky buněčného cyklu. Její stupeň koreluje s agresivitou nádoru a v některých studiích bylo zjištěno, že jimi získaná prognostická informace je validnější než Ki67 nebo gradingu tumoru (121). Navíc lze díky informaci o tom, ve které části buněčného cyklu se převážná část buněk nachází, cíleně

podat určité chemoterapeutikum. V tomto smyslu je použití těchto markerů prognostické a prediktivní.

## **2.4 Genomová analýza**

Zcela nový pohled do patogeneze nádorů obecně a vývoje biomarkerů představuje genomová analýza. Vstoupila do popředí zájmu s prudkým rozvojem molekulární genetiky, možnostmi buněčného profilování a tkáňové mikroanalýzy. Jedná se o studium globální exprese genů, ať už na bázi DNA, RNA, mikroRNA nebo proteinů. Nejde přitom o studii specifických molekulárních pochodů, avšak o výzkum charakteristických molekulárních znaků, které korelují s určitým klinickým stavem, např. výskytem nádoru v organismu (skrining z vyšetření moči), recidivy nádoru (dispenzarizace) či změnou biologického chování.

V posledních letech se objevilo značné množství studií popisující množství různých genových expresí. Jejich interpretace je stále nejasná a vyvolává řadu otázek (122). Např. je známý fakt, že korelace mezi geny, jejich transkripty nebo transláty z jednotlivých studií je minimální, ne-li žádná. Důvodů je řada, např. malý počet nemocných v kohortách, retrospektivní design studií a analýza archivovaných vzorků, absence validace výsledků a postupů mezi jednotlivými laboratořemi a populacemi, neselektivní extrakce genetického materiálu z tkáně ap. (123). Limitací je prozatím i vysoká cena dostupných technologií. I přes všechna uvedená fakta je genomová analýza slibný a moderní směr vývoje, který pravděpodobně v budoucnu povede k pochopení mnoha klinických změn a znaků na molekulární úrovni.

### **2.4.1 Proteomika**

Proteomika je studium proteinů, včetně jejich struktury a funkce, s použitím moderních technologií, jako je 2-dimenzionální gelová elektroforéza, hmotnostní spektrometrie nebo např. SELDI (surface enhanced laser desorption/ionisation) (124). Výhodou SELDI je možnost rychlé analýzy obrovského množství proteinů ve velkém množství vzorků, nicméně limitací je molekulární velikost proteinů. Nadějnými skupinami proteinů jsou například matrixové metaloproteázy (MMP) nebo CXCL-1 (skupina chemokinů funkčně spojená s tumorigenezí) (125). Cílem proteomiky je vytipování skupin proteinů a tedy potenciálních biomarkerů a jejich další analýza pomocí konvenčních metod (např. ELISA).

### **2.4.2 Epigenetika**

**Epigenetika** zkoumá reverzibilní změny ve funkcích genů, aniž by se změnila nukleotidová sekvence (126). Nejčastější epigenetická změna u karcinomu močového měchýře je spojena s methylací DNA. Tento proces je katalyzován DNA methyltransferázou. Methylace probíhá na nukleové bazi cytosinu v oblasti genů, které jsou zodpovědné za genovou promoci. Jejich funkce spočívá v down-regulaci v této oblasti a tedy genovém „silencing“ (127). Tento „silencing“ tumor supresorových genů znamená buněčnou transformaci a progresi (128). Yu et al. amplifikovali větší množství hypermethylovaných genových sekvencí pomocí methylace specifické PCR (129). Našli 11 genů se signifikantně vyšší methylací v buňkách nádoru proti kontrolám. Tato skupina genů měla v detekci uroteliálního karcinomu senzitivitu a specifitu 91,7 %, respektive 87,6 %. Jednotlivé geny, použité mimo skupinu samostatně, byly bezcenné. Výsledek byl rozdílný v čínské a americké populaci, což svědčí pro mezipopulační epigenetickou disparitu.

### **2.4.3 Genomika**

Genomika je studium genových sekvencí DNA a RNA a rozdílů v genových expresích mezi tkáněmi, které vedou k různým buněčným a tkáňovým fenotypům (130). Využívá moderní technologie, jako jsou genová a tkáňová mikroanalýza, které dokážou analyzovat velké množství sekvencí v krátkém časovém intervalu a vytvořit tedy určitý genový profil (131). Například Roser et al. zkoumali profil cDNA 46 pacientů s UK močového měchýře v nádorových buňkách získaných z jejich moči (132). Identifikovali celkem 24 genů, z nichž určili 14 k typizaci buněk jako diagnostických markerů karcinomu močového měchýře. Tento molekulární rys buněk měl senzitivitu 90 % a specifitu 65 % k určení diagnózy a může být validizován na větším souboru s amplifikací cDNA pomocí qPCR (kvantitativní = real time PCR). Naopak RT-PCR (reverse transcription PCR) amplifikuje sekvence cDNA po předchozí reverzní transkripci RNA sekvencí na cDNA. Hanke et al. analyzovali poměr několika mRNA izolovaných z moči u nemocných s UK močového měchýře (133). Poměr mRNA ETS-2 ku uPA byl nezávislým faktorem detekce nádoru se specificitou a senzitivitou 89 %. U LG nádorů byla senzitivita 53 %.

### **2.4.4 Volná DNA (cfDNA)**

Volné deoxy-ribo-nukleové kyseliny (cell-free deoxyribonucleic acids = cfDNA) cirkulující v krvi byly objeveny ve 40. letech (134). Později byl odhalen jejich potenciál k detekci různých druhů nádorů a k monitoraci jiných probíhajících nezhoubných onemocnění, jako je akutní infarkt myokardu, rejekce renálního transplantátu, nebo k prenatální diagnostice vrozených malformací z maternální krve (135, 136, 137). Některé studie se zabývaly vztahem hypermetylace volných sérových kyselin s prognózou

karcinomu močového měchýře a karcinomu ledviny (138, 139). Například Ellinger et al. ve své studii prokázali na kohortě 45 pacientů, kteří podstoupili radikální cystektomii, asociaci přítomnosti hypermetylované DNA v séru pacientů s horším nádorově specifickým přežíváním (139).

Na rozdíl od relativně velkého množství poznatků o cfDNA v séru existuje relativně málo dat o cfDNA nacházející se v moči (ucfDNA). CfDNA obecně pochází z buněk podléhajících nekróze a apoptóze, nicméně jsou vylučovány i normálními žijícími buňkami. Do moči se dostávají buď z buněk urogenitálního traktu anebo je jejich původ transrenální, tedy se jedná o cfDNA procházející glomerulární filtrací (140, 141). Zatímco buňky apoptotické produkují krátké uniformní fragmenty DNA, buňky nádorové, které často podléhají nekróze z důvodu rychlého růstu tkáně bez dostatečné angiogeneze, produkují delší intaktní fragmenty DNA (142). DNA integrity index je pak definován jako poměr dlouhých a krátkých fragmentů, který je vyšší u pacientů s malignitou. Tento poznatek byl prokázán u nemocných s gynekologickými nádory a nádorem prsu (143).

U nemocných s nádory močového měchýře byl tento postup testován např. ve studii Casadia et al., kde byly kvantifikovány sekvence delší než 250 bp pomocí real time PCR (144). Autoři našli signifikantní rozdíly mezi pacienty s nádory a zdravými dobrovolníky (AUC 0,834) a pacienty se symptomy dolních močových cest (AUC 0,796). V jiné studii výsledky naopak tak povzbudivé nebyly, neboť se sérové hodnoty integrity DNA a hladiny dlouhých fragmentů  $\beta$ -actinu u pacientů s nádory blížily pacientům po TUR s benigním nálezem (145). Zancan et al. použili 4 molekulárně-biologické laboratorní metody ke kvantifikaci cfDNA u 45 pacientů s nádory a 87 zdravých dobrovolníků. Ani u jedné z metod nebyly prokázány signifikantní rozdíly mezi těmito dvěma skupinami (146). V jiné studii autoři stanovovali hladinu cfDNA v korelaci s hladinou kreatininu v moči a rozdíly byly naopak signifikantní (147).

Při studiu dostupné literatury je tedy zcela zjevné, že volba adekvátní metodologie a její standardizace mají zásadní vliv na získané výsledky. UcfDNA je možno izolovat buď komerčně dostupnými sety nebo klasickými laboratorními technikami (148). Obecně existují 3 metodologické přístupy při kvantifikaci cfDNA v moči: spektrofotometrie, fluorometrické metody a metody amplifikační (149).

V naší první práci jsme se z výše uvedených důvodů soustředili na zvolení adekvátní dobře definované reprodukovatelné metodologie stanovení cfDNA v moči a na standardizaci její kvantifikace. Zkoumali jsme efektivitu takto definované metodologie v rozlišení mezi pacienty s UK močového měchýře různých stádií a buněčných diferenciací a pacienty s jinými benigními urologickými diagnózami včetně zdravých dobrovolníků.

#### **2.4.5 *Micro RNA (miRNA)***

MiRNA jsou jednovláknové krátké nekódující sekvence RNA složené z 21 – 23 nukleotidů, které slouží jako regulátory genové exprese (epigenetická regulace). Jsou proto středem pozornosti ve výzkumu poslední doby. Doposud bylo identifikováno již více než 1000 sekvencí. V buňkách jsou produkovány mimo jádro a vážou se ke komplementárním sekvencím na mRNA, čímž ovlivňují její translaci a tvorbu proteinů. Poměry miRNA v buňkách nádoru mohou sloužit jako biomarkery k detekci karcinomu (150). Vzhledem ke zjištěné aberantní expresi v lidských nádorech navíc mohou sloužit ke klasifikaci nádorů (151). Profily miRNA měly v klasifikaci špatně diferencovaných nádorů dokonce větší přesnost než mRNA, což naznačuje jejich potenciální roli v diagnostice těchto nádorů (152).

V některých případech změny v profilech miRNA poukazují na patologické procesy ještě před jejich klinickou manifestací (153). Exprese některých miRNA u UK je specifická pro pokročilost stádia onemocnění a stupeň



buněčné diferenciaci (154). V souvislosti s detekcí UK močového měchýře byla popsána dysregulace u celé řady miRNA, jak ukazuje Tab. 10. Analýzy prováděné na tkáních nádorů a zdravých jedinců pomohly objasnit funkci některých miRNA a mají tedy význam pro výzkum profilu miRNA v moči, coby jednoznačně nejméně invazivně dostupného média, které je v těsném kontaktu s nádorem (155).

Zajímavých výsledků bylo dosaženo ve studiích se supernatantem moči. Zhang et al. našli 4 deregulované miRNA, jejichž aktivita byla signifikantně snížena u nemocných s nádory (miR-99a, miR-125b, miR-133b a miR-143) (156). Hladina miR-99a a miR-125b se vrátila do normálu 4 týdny po odstranění nádoru. Korelace stupně diferenciaci nádoru a rizika vzniku recidivy byla ukázána ve studii Yuna et al. (miR-145 a miR-200a) (157). Je jasné, že za vhodně zvolených klinických situací mají některé miRNA potenciál k tomu stát se neinvazivním biomarkerem při vyšetření jejich profilů v moči a zaslouží si tedy pozornost v probíhajícím výzkumu. Jejich nespornou výhodou je velmi dobrá stabilita v klinických vzorcích, protože jsou na rozdíl od mRNA odolné vůči přirozeně přítomným RNázám, vysokým a nízkým teplotám a extrémním hodnotám pH (158). Navíc jsou velmi dobře detekovatelné v lidské plazmě a séru pomocí RT-PCR i při velmi nízkých hladinách (159).

V naší druhé práci jsme se pokusili získat profil miRNA v supernatantu moči pacientů s různými stádii UK močového měchýře a porovnat exprese těchto miRNA s expresemi pacientů léčených pro benigní urologické onemocnění a zdravých dobrovolníků.

Tato dizertační práce je koncipována jako „klasická“, tedy nosné téma je společné, a to význam volných nukleových kyselin v moči při diagnostice UK. Některé rysy výzkumu ucfDNA a miRNA byly však velmi odlišné, zejména metodologie. Oba typy markerů jsou tedy odděleny a prezentovány samostatně.

**Tab. 10. Přehledná charakteristika vědeckých studií a jednotlivých miRNA ve vztahu k diagnostice UK močového měchýře.**

| Materiál                | Normalizace | Vybrané miRNA   |   | Reference                |
|-------------------------|-------------|---|---|--------------------------|
|                         |             | „Down“<br>regulace  | „Up“<br>regulace  |                          |
| Tkáň                    | U6          | miR-143<br>miR-145<br>miR-125b<br>miR-199b  |   | Lin (155)                |
| Tkáň                    | U6          | miR-145<br>miR-125b<br>miR-199a<br>let-7c<br>miR-99a  | miR-141-3p<br>miR-200c-3p<br>miR-21-5p  | Zhou (160)               |
| Tkáň                    | RNU44, U6B  | miR-1<br>miR-133a/b<br>miR-145<br>miR-143<br>miR-204  | miR-200b<br>miR-182<br>miR-614<br>miR-1231<br>miR-654-3p<br>miR-921<br>miR-1281 | Pignot (161)             |
| Tkáň                    | RNU48, U6   | miR-133a<br>miR-204<br>miR-1<br>miR-139-5p<br>miR-370<br>miR-133b<br>miR-574-3p<br>miR-376c<br>miR-214<br>let-7c<br>miR-140-3p<br>miR-134<br>miR-411<br>miR-218<br>miR-196b<br>miR-186<br>miR-320 |   | Yoshino (162)            |
| Tkáň                    | 5s RNA      |   | miR-30b<br>miR-141<br>miR-200c  | Mahdavinezhad (163, 164) |
| Tkáň: NMIBC versus MIBC | miR-222     | miR-30b<br>miR-31<br>miR-141<br>miR-200a<br>miR-200b<br>miR-200c  | miR-99a   | Wszolek (165)            |

|   |   |  |                              |               |
|---|---|--|------------------------------|---------------|
|   |   | miR-429<br>miR-205<br>miR-21   |                              |               |
| Tkáň  | U6  | miR-99a  |                              | Feng (166)    |
| Tkáň  | RNU6b   | miR-1<br>miR-99a<br>miR-125b<br>miR-133a<br>miR-133b<br>miR-143<br>miR-1207-5p | miR-16<br>miR-96<br>miR-183  | Zhang (156)   |
| Plazma  | U6  | miR-99a  |                              | Feng (166)    |
| Plná moč  | miR-152   |  | miR-126<br>miR-182           | Hanke (150)   |
| Plná moč,<br>výplach<br>měchýře a<br>dutého<br>systému ledvin | Vybrané<br>miRNA byly<br>kvantifikovány<br>pomocí<br>reverzní<br>transkripce a<br>real time PCR |  | miR-182                      | Wei (167)     |
| Močový<br>supernatant   | RNU6B   | miR-99a<br>miR-125b<br>miR-133b<br>miR-143                                     | miR-16<br>miR-96<br>miR-183  | Zhang (156)   |
| Močový<br>supernatant   | U6  | miR-125b   |                              | Snowdon (168) |
| Močový<br>supernatant   | U6  | miR-145<br>miR200a   |                              | Yun (157)     |
| Močový<br>supernatant   | U6  |  | miR-106b<br>miR-93<br>miR-25 | Zhou (169)    |
| Močový<br>supernatant   | U6  |  | miR-214                      | Kim (170)     |

### **3. Kvantifikace volné DNA v moči pacientů jako neinvazivní biomarker k detekci uroteliálního karcinomu močového měchýře**

#### **3.1 Hypotézy a cíle práce**

Hladiny volných nukleových kyselin v tělesných tekutinách korelují s přítomností maligního onemocnění nebo s probíhajícím nezhoubným onemocněním, které lze pomocí těchto markerů monitorovat. Pro detekci uroteliálního karcinomu z moči pacienta lze použít několik metodologických postupů, žádný však nebyl standardizován. Většina autorů použila jako detekční metodu real-time PCR, nicméně markery přítomnosti nádoru se lišily (integrita ucfDNA, poměr koncentrací ucfDNA a kreatininu v moči, mikrosatelity, topoizomeraza-IIA) (144, 171, 172, 173). Hlavním cílem naší práce bylo vytvořit standardizovaný reprodukovatelný postup ke stanovení hladiny volných nukleových kyselin v moči a určení efektivity tohoto markeru k detekci UK.

#### **Konkrétní hlavní cíle:**

1. Standardizace kvantifikace volné DNA v moči pacientů a kontrol.
2. Určit, zda takto kvantifikovaná hladina ucfDNA koreluje s přítomností uroteliálního nádoru.
3. Stanovit cut-off hodnoty pro diagnostiku uroteliálního karcinomu, pro diagnostiku jednotlivých stádií a stupňů buněčné diferenciaci nádoru, stanovit senzitivity a specificity, ev. prediktivní hodnoty.
4. Určit, zda hladiny cfDNA ovlivní senzitivitu a specificitu cytologie moči při diagnostice LG a HG uroteliálního karcinomu.

### 3.2 Materiál a metodika

#### *Charakteristika pacientů a kontrol*

Celkem bylo v průběhu 2,5 let do studie zařazeno 119 probandů, kteří podepsali informované souhlasy. Devatenáct z nich bylo vyřazeno pro pozitivní kultivaci moči s leukocyturií. Zbývajících 100 subjektů se skládalo z 23 zdravých dobrovolníků, 11 pacientů s benigním urologickým onemocněním (urolitiáza, striktura uretry, hyperplázie prostaty apod.) a 66 pacientů s UK močového měchýře (PACIENTI) prokázaným pomocí cystoskopie, kteří byli těsně před operací pro tuto diagnózu (TUR nebo radikální cystektomie). Histologická diagnóza byla následně potvrzena histopatologem se stanovením stádia onemocnění a stupně diferenciac buněk (WHO 2004). U kontrolních pacientů (KONTROLY) bylo provedeno základní biochemické vyšetření moči a ultrasonografie naplněného močového měchýře (pokud nebyla provedena cystoskopie). Všechny subjekty studie měly negativní osobní onkologickou anamnézu (vyjímaje nádor močového měchýře u PACIENTŮ) a zároveň byl u všech vyloučen nádor horních močových cest pomocí CT-IVU nebo ultrasonografie. Souhrn údajů o subjektech je uveden v Tab. 11.

**Tab. 11. Souhrnná charakteristika souboru.**

|          | N  | Věk (medián, 95% CI) | muž | žena |                               |       |       | N  |
|----------|----|----------------------|-----|------|-------------------------------|-------|-------|----|
| KONTROLY | 34 | 62,5 (57,7 – 66,2)   | 22  | 12   | Zdraví dobrovolníci           |       |       | 23 |
|          |    |                      |     |      | Benigní urologická onemocnění |       |       | 11 |
| PACIENTI | 66 | 67,5 (64,0 – 69,0)   | 44  | 22   | pTa                           | 21 LG | 4 HG  | 25 |
|          |    |                      |     |      | pT1                           | 8 LG  | 12 HG | 20 |
|          |    |                      |     |      | pT2                           | 0 LG  | 9 HG  | 9  |
|          |    |                      |     |      | pT3                           | 0 LG  | 6 HG  | 6  |
|          |    |                      |     |      | pT4                           | 0 LG  | 5 HG  | 5  |
|          |    |                      |     |      | CIS                           |       |       | 1  |

U všech vzorků moči byla standardně vyšetřena cytologie s použitím klasifikace dle PAP (PAP I, II = negativní, PAP = III-V pozitivní). Za

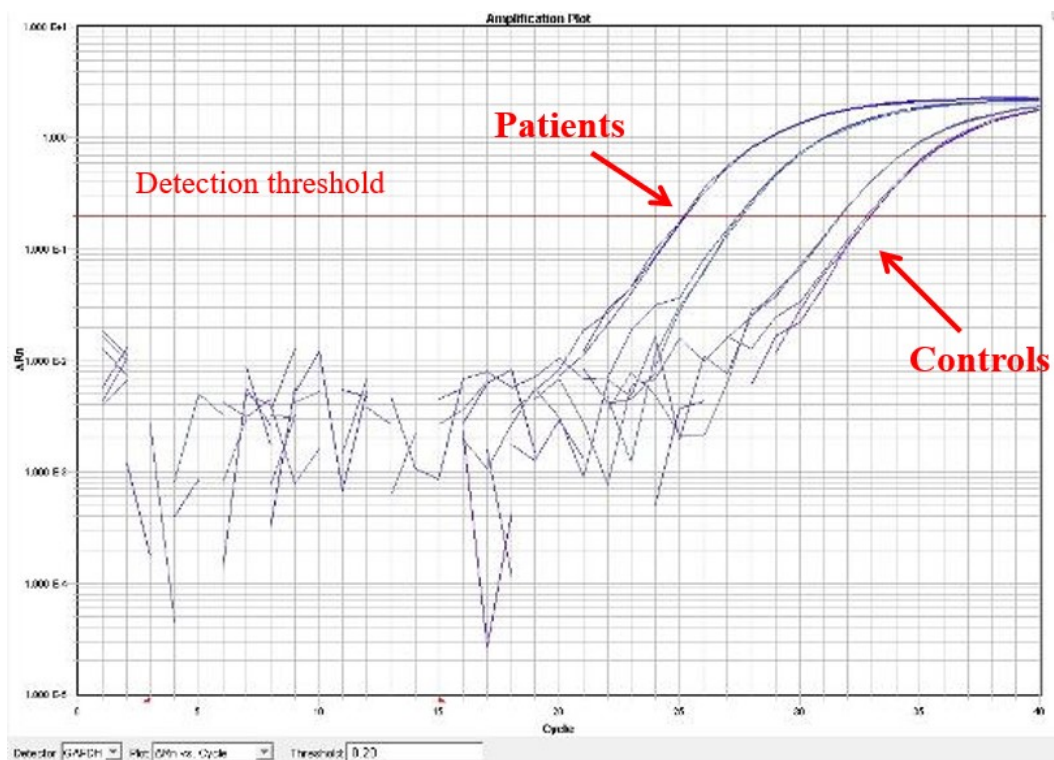
adekvátní objem bylo považováno množství 30-50 ml a ranní moč nebyla vhodná vzhledem k vysokému zastoupení cytolýzy přítomných buněk (89). Nebylo jasné, zda bude platit stejný závěr i pro moč ke kvantitativnímu stanovení cfDNA, nicméně z metodologického hlediska bylo potřeba sjednotit dobu kontaktu nádoru s močí. Pacienti s nádory byli přijímáni den před operací, z praktického hlediska jsme tedy nabírali první ranní moč v den operace a poté druhou porci moči zhruba po dvou hodinách od první mikce. V obou porcích byla stanovena koncentrace cfDNA (viz dále *Metodika*). U některých pacientů, kteří trpěli iritační symptomatologií a močili v relativně krátkých intervalech, jsme zaznamenali extrémně vysoké hodnoty koncentrace cfDNA. Poskytované objemy moči u těchto pacientů byly velmi malé. Rozhodli jsme se proto korelovat koncentrace a objemy prvních a druhých porcí moče, což bylo provedeno u prvních 27 probandů (11 zdravých dobrovolníků, 6 pacientů s benigním urologickým onemocněním a 10 pacientů s nádorem močového měchýře). Následně byly porovnány celkové objemy ucfDNA (TA DNA) mezi kontrolami a pacienty různých patologických stádií a buněčných diferenciací a výsledky korelovány s cytologií moči.

### *Metodika*

Každá vyšetřovaná přirozeně vymočená moč byla poskytnuta ve sterilní nádobě a byl zaznamenán její objem. Z nádoby byly odebrány potřebné vzorky na biochemické vyšetření, kultivaci a cytologii a ihned odeslány k vyšetření na příslušné oddělení. Pro účely stanovení koncentrace cfDNA bylo odebráno 50ml moči, která byla stabilizována pomocí 535 $\mu$ l 0,5M (= 1mol/litr) EDTA a centrifugována při 4000g po dobu 10 minut a 10°C. Získaný supernatant byl uložen v teplotě -20°C do dalšího zpracování. Volná DNA byla izolována z 2ml supernatantu pomocí QIAamp Circulating Acid Kit (Qiagen, Germany) podle doporučení výrobce a eluována v 50 $\mu$ l

elučního roztoku. Kvantifikace cfDNA byla provedena pomocí real-time PCR (ABI PRISM 7900HT, Applied Biosystems, USA) za použití referenčního genu pro GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (genová banka: NG\_007073.2). Referenční křivka (10ng/μl – 3pg/μl) byla vytvořena opakovanou dilucí standardní genomické DNA ((TaqMan Control Genomic DNA (Human), 10ng/μl, Applied Biosystems, USA)). PCR proběhlo na 5μl extrahované DNA v celkovém reakčním objemu 20μl. Všechny vzorky byly vyšetřeny v triplikátech (Graf 8).

**Graf 8. Amplifikační plot z real-time PCR (qPCR). Čím dříve (méně cyklů) dosáhne amplifikační křivka prahové hladiny (Detection threshold), tím větší koncentrace DNA je ve vzorku obsažena (jednotka = genomový ekvivalent/5 μl). Je zjevné, že moč pacientů má větší koncentrace cfDNA než moč kontrol (červené šipky).**



### 3.3 Statistická analýza

Ke statistickému zhodnocení získaných výsledků byly použity neparametrické testy. Koncentrace ucfDNA, objemy porcí moče a celkové množství ucfDNA v první a druhé ranní porci moči byly testovány pomocí Wilcoxonova testu pro párové veličiny. Pro korelaci objemů moči a koncentrací ucfDNA byla použita regresní analýza. Rozdíly v celkových množstvích ucfDNA pro více skupin (kontroly, benigní, pT1-4) byl použit Kruskal-Wallisův test. Testování rozdílů při rozdělení na dvě skupiny (pacienti a kontroly) bylo provedeno s použitím Mann-Whitneyho testu. Pro kategorizaci parametrů ucfDNA byla využita analýza ROC křivky. Jako cut-off bod pro rozdělení skupin byl zvolen Youden index (maximum hodnoty senzitivita + specificita - 1). Kategorizovaná data byla dále testována ve více skupinách (zdraví dobrovolníci, benigní onemocnění, různá stádia a grading nádoru močového měchýře) za použití Chi-kvadrát testu a při post-hoc analýze byla provedena Bonferroniho korekce. Pro jednotlivé skupiny byly také určeny hodnoty senzitivity a specificity testu, eventuálně negativní/pozitivní prediktivní hodnoty. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky signifikantní. Všechny analýzy byly provedeny programem MedCalc (MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgie).

### 3.4 Výsledky

#### *Kvantifikace ucfDNA*

Jak již bylo uvedeno, u prvních 27 pacientů a kontrol byla vyšetřována první a druhá ranní moč odebrané standardizovaným způsobem a analyzována koncentrace ucfDNA. Druhé ranní porce moči měly signifikantně nižší objemy (což je logické), ale zato signifikantně vyšší koncentrace s extrémně vysokými hodnotami u velmi malých objemů (Tab. 12). Naopak celkové množství ucfDNA (TA DNA = total amount) v jedné porci moči, počítáno



jako  $TA = c \times V$ , se mezi porcemi nelišilo. Při porovnání skupiny kontrol a pacientů nebyly nalezeny významné rozdíly mezi oběma skupinami, co se týká věku, pohlaví, koncentrací, TA DNA a objemů moči výjma objemů druhých porcí moči, které byly významně nižší u PACIENTŮ ( $p = 0,036$ ) (pacienti s nádory měchýře byly vesměs v den odběru operováni, lačnili tedy od půlnoci předešlé noci) (Tab. 13, 14).

**Tab. 12. Celkový přehled koncentrací, objemů a celkových množství ucfDNA (TA DNA) v první a druhé ranní porci moči.**

|             | Porce moči | #  | Medián (95% CI)               | p            |
|-------------|------------|----|-------------------------------|--------------|
| Koncentrace | 1.         | 27 | 71,3<br>(23,1 - 119,7)        | <b>0,044</b> |
|             | 2.         | 27 | 107,8<br>(46,3 - 191,4)       |              |
| Objem       | 1.         | 27 | 300,0<br>(200,0 - 340,9)      | <b>0,002</b> |
|             | 2.         | 27 | 160,0<br>(100,0 - 251,4)      |              |
| TA DNA      | 1.         | 27 | 12936,0<br>(7084,6 - 35739,8) | 1,0          |
|             | 2.         | 27 | 14124,0<br>(6258,2 - 39314,4) |              |

**Tab. 13. Porovnání zastoupení pohlaví ve skupinách KONTROL a PACIENTŮ (chí-kvadrát test).**

|         |      | KONTROLY  | PACIENTI | p    |
|---------|------|-----------|----------|------|
| Pohlaví | Muž  | 14 (48 %) | 6 (24 %) | 0,41 |
|         | Žena | 3 (12 %)  | 4 (16 %) |      |

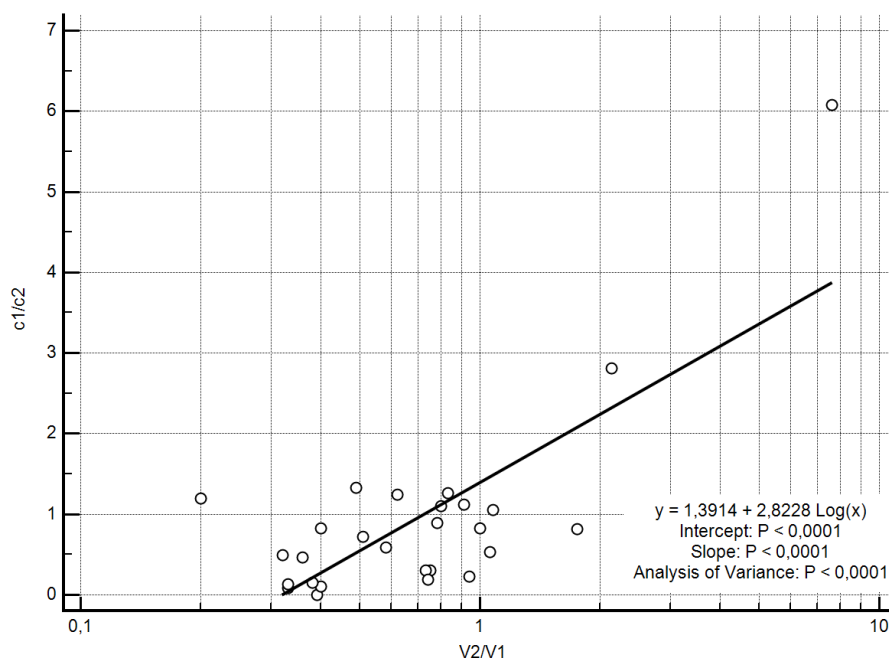
Při použití regresní analýzy jsme zjistili logaritmickou závislost mezi objemy a koncentracemi u všech 27 probandů ( $p = 0,0001$ ) (Graf 9). Z toho

důvodu jsme standardizovali kvantifikaci ucfDNA jako součin koncentrace a objemu:  $TA = c \times V$ , a TA bylo použito v analýzách diagnostické účinnosti biomarkeru (viz dále *Diskuze*). Z praktického hlediska nebyla první ranní moč použita k vyšetřování TA DNA z důvodu rutinního vyšetřování cytologie moči jako současného zlatého standardu v neinvazivní diagnostice UK močového měchýře. Naopak byla použita jakákoli jiná moč než první získaná zhruba 2 hodiny po předchozí mikci.

**Tab. 14. Porovnání jednotlivých parametrů v obou porcích moči mezi skupinami KONTROL a PACIENTŮ (p hodnoty v sloupku zcela vpravo) a v jednotlivých skupinách (zde byly rozdíly, kromě objemů u kontrol, nevýznamné nebo na hranici významnosti, což je dáno malým počtem probandů v podskupinách) (Wilcoxonův párový test mimo věk).**

|                 |               | Skupina  |                               |       |          |                               |      | KONTR<br>x PAC |
|-----------------|---------------|----------|-------------------------------|-------|----------|-------------------------------|------|----------------|
|                 |               | KONTROLY |                               |       | PACIENTI |                               |      |                |
|                 | Porce<br>moči | #        | Medián<br>(95% CI)            | p     | #        | Medián<br>95% CI              | p    | p              |
| Věk             | ---           | 17       | 61,0<br>(52,0 - 64,0)         | ---   | 10       | 60,5<br>(50,4 to 74,1)        | ---  | 0,55           |
| Koncen<br>trace | 1.            | 17       | 33,4<br>(22,5 - 118,4)        | 0,07  | 10       | 132,7<br>(14,3 - 246,7)       | 0,43 | 0,24           |
|                 | 2.            | 17       | 56,8<br>(15,9 - 217,4)        |       | 10       | 125,4<br>(58,9 - 500,5)       |      | 0,16           |
| Objem           | 1.            | 17       | 310,0<br>(210,3 - 409,7)      | 0,006 | 10       | 230,0<br>(129,5 - 331,5)      | 0,08 | 0,22           |
|                 | 2.            | 17       | 210,0<br>(150,2 - 329,7)      |       | 10       | 100,0<br>(100,0 - 213,5)      |      | 0,036          |
| TA<br>DNA       | 1.            | 17       | 10018,8<br>(4855,8 - 35329,8) | 0,85  | 10       | 18084,0<br>(3742,2 - 74398,8) | 0,85 | 0,32           |
|                 | 2.            | 17       | 9570,0<br>(3776,7 - 43072,9)  |       | 10       | 15378,0<br>(7455,0 - 62287,1) |      | 0,42           |

**Graf 9. Regrese je dána poměrem objemu druhé a první porce moči (nezávislá veličina) a poměrem koncentrace ucfDNA první a druhé porce moči u všech probandů (27). Regresní vztah je tedy:  $y = a + b \cdot \log(x)$ . Poměr koncentrací ( $c_1/c_2$ ) a objemů ( $V_2/V_1$ ) je dán předpokladem, že  $c_1 \cdot V_1 \approx c_2 \cdot V_2$ .**



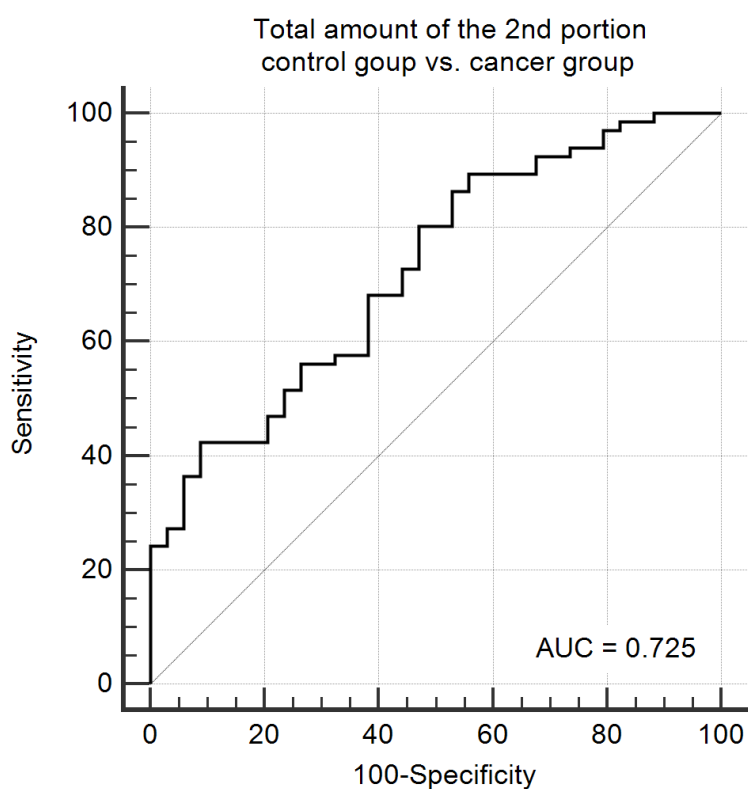
### *ROC analýza*

Na základě naměřených TA DNA u pacientů a kontrol byla provedena ROC analýza a zkonstruována ROC křivka. Oblast pod křivkou (AUC) byla 0,725. Byly stanoveny cut-off hodnoty s příslušnými senzitivitami a specificitami s nejlepší kombinací senzitivity 42,4 % a specificitou 91,2 % (Youden index  $J = 0,336$ ) (Tab. 15, Graf 10).

**Tab. 15 Přehled senzitivit a specifict TA DNA při detekci nádoru močového měchýře (všechna stádia, různé cut-off hodnoty).**

| Cut-off [ng] | Senzitivita [%] | Specifická [%] |
|--------------|-----------------|----------------|
| 87991        | 36.4            | 94.1           |
| 52800        | 47.0            | 79.4           |
| 39124        | 56.1            | 73.5           |
| 19866        | 68.2            | 61.8           |
| 13601        | 80.3            | 52.9           |
| 8257         | 89.4            | 44.1           |

**Graf 10 ROC křivka pro skupiny KONTROL a PACIENTŮ.**



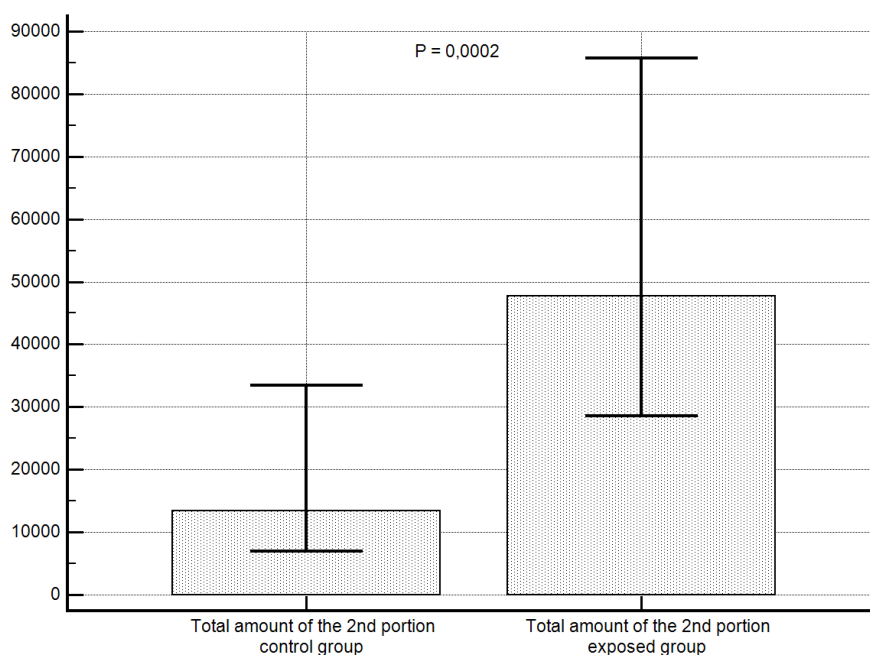
*Rozdíly v TA DNA mezi PACIENTY a KONTROLAMI dle stádií a stupně diference buněk*

Při porovnání TA DNA mezi KONTROLAMI (n = 34) a PACIENTY (n = 66) byly zjištěny významně vyšší hladiny u PACIENTŮ (p = 0,0002) (Tab. 16, Graf 11).

**Tab. 16. Přehled rozdílů v uvedených parametrech mezi skupinami pacientů a kontrol (Mann-Whitney test).**

|             | KONTROLY |                                  | PACIENTI |                                | p             |
|-------------|----------|----------------------------------|----------|--------------------------------|---------------|
|             | #        | Medián<br>(95% CI)               | #        | Medián<br>95% CI               |               |
| Věk         | 34       | 62,5<br>(57,7 to 66,2)           | 66       | 67,5<br>(64,0 to 69,0)         | 0,057         |
| Koncentrace | 34       | 69,0<br>(44,8 to 183,5)          | 66       | 321,4<br>(187,5 to 807,0)      | < 0,0001      |
| Objem       | 34       | 200,0<br>(158,3 to 255,2)        | 66       | 140,0<br>(110,0 to 160,0)      | 0,007         |
| TA DNA      | 34       | 13407,2400<br>(6967,5 - 33417,6) | 66       | 47731,2<br>(28551,1 - 85699,9) | <b>0,0002</b> |

**Graf 11. Distribuce TA DNA mezi KONTROLAMI (control group) a PACIENTY (exposed group).**

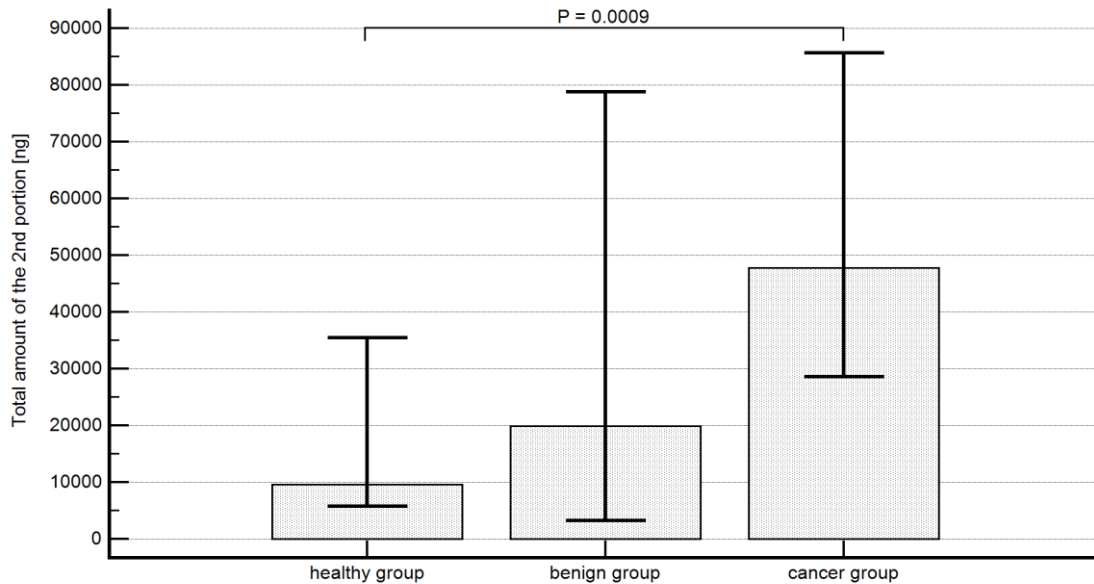


U pacientů s benigním urologickým onemocněním lze předpokládat vzhledem k probíhajícím změnám v urotelu vyšší obsah volných DNA, což podpořil Kruskal-Wallisův test, který ukázal rozložení hladin TA DNA mezi zdravými dobrovolníky, skupinou s benigním urologickým onemocněním a PACIENTY ( $p = 0,00085$ ). V post hoc analýze však nebyly prokázány rozdíly mezi skupinami benigních onemocnění a PACIENTŮ (Graf 12).

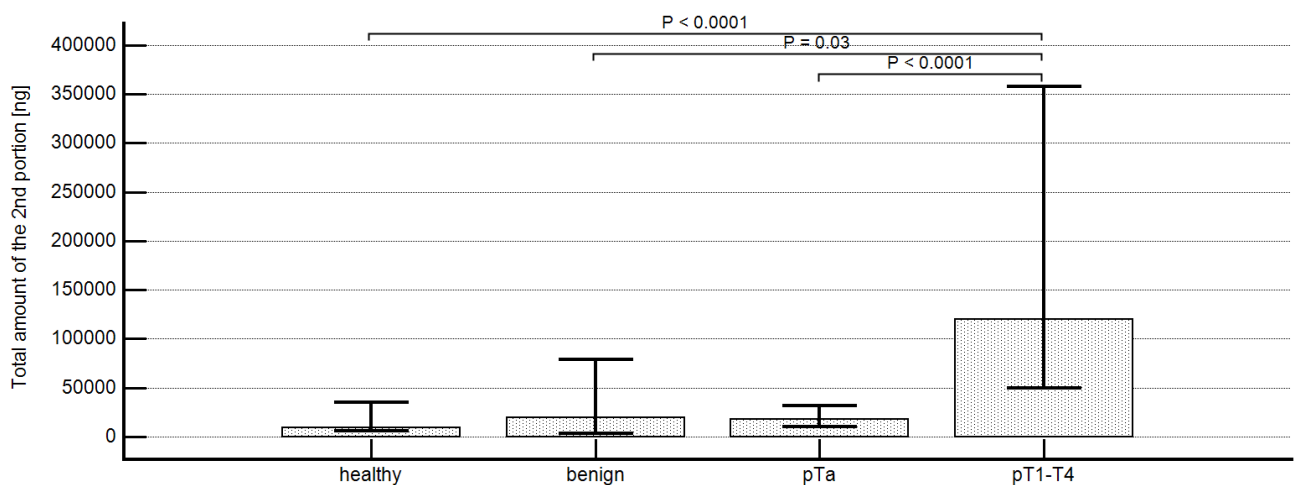
Pacienti s nádory byly proto dále rozdělení podle stádií na pTa (zahrnující pouze 4 pacienty s HG nádorem, většina měla LG nádor) a vyšší stádia (pT1-4), což jsou klinicky významná stádia. Kruskal-Wallisův test s post hoc analýzou prokázal významné rozdíly mezi skupinou pacientů s vyššími stádii onemocnění a oběma skupinami kontrol, zatímco nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi kontrolami a skupinou pacientů s nádory pTa. Naopak byly zaznamenány významné rozdíly mezi nádory pTa a vyššími stádii onemocnění, což poukazuje podobnost skupiny pTa a kontrolami v hladinách TA DNA (Graf 13). Dle ROC analýzy byla nejlepší senzitivita a specificita k detekci nádoru pT1-4 62,5 %, respektive 91,2 %, při nejlepší cut-off hodnotě 65055 ng (Youden index) (Graf 14).

Low grade nádory tvořily většinu stádií pTa, avšak více než polovinu nádorů pT1. Rozložení hladin TA DNA mezi kontrolami, LG nádory a HG nádory přesto nebylo překvapivé. Významné rozdíly byly nalezeny mezi kontrolami/HG nádory a LG/HG nádory, rozdíly mezi LG nádory a kontrolami zaznamenány nebyly (Graf 15). Senzitivita a specificita hladiny TA DNA při detekci HG nádoru byla 59,5 %, respektive 91,2 %.

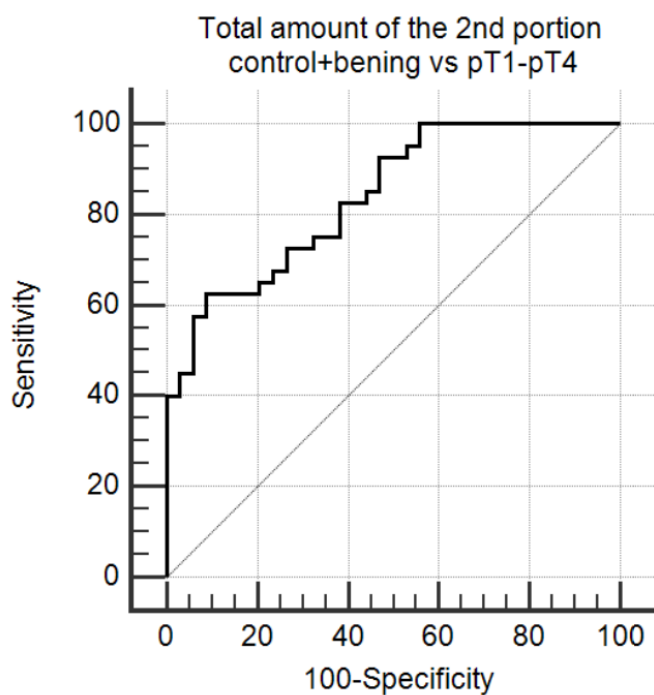
**Graf 12. Distribuce TA DNA mezi zdravými dobrovolníky (healthy group), skupinou s benigním urologickým onemocněním (benign group) a pacienty (cancer group). Konektory spojují skupiny s významnými rozdíly.**



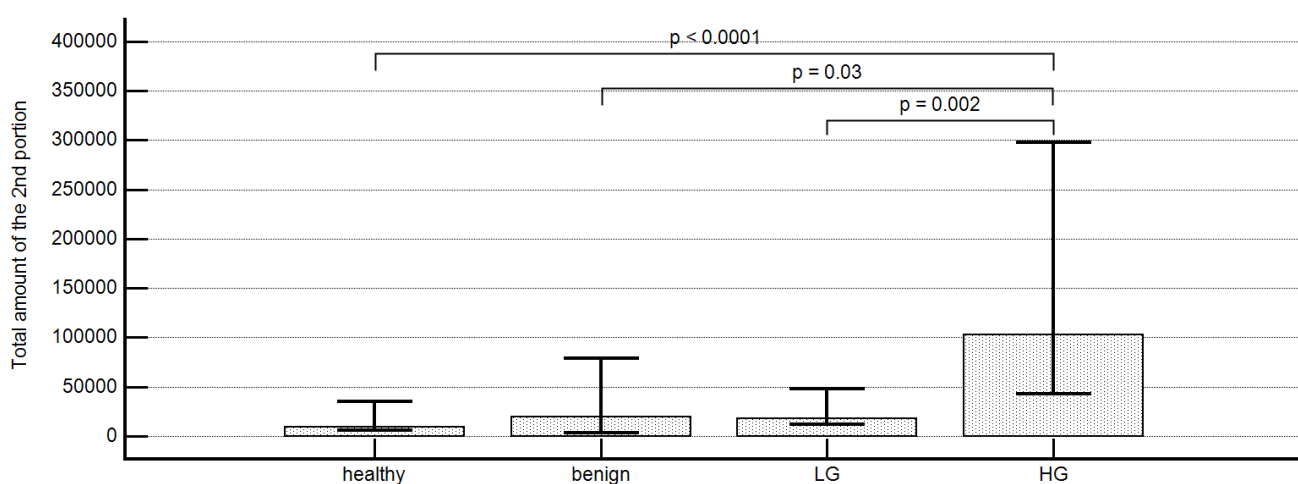
**Graf 13. Distribuce TA DNA mezi zdravými dobrovolníky (healthy), skupinou s benigním urologickým onemocněním (benign), pacienty s nádory pTa a vyššími stádii (pT1-pT4). Konektory spojují skupiny s významnými rozdíly.**



**Graf 14. ROC křivka pro skupiny KONTROLY (control+benign) a stádia pT1-4.**



**Graf 15. TA DNA ve skupinách kontrol (zdraví dobrovolníci=healthy, benigní onemocnění=benign), LG nádorů a HG nádorů. Konektory spojují skupiny se signifikantními rozdíly (Kruskal-Wallisův test s post hoc analýzou).**





### *Cytologie moči v detekci UK močového měchýře*

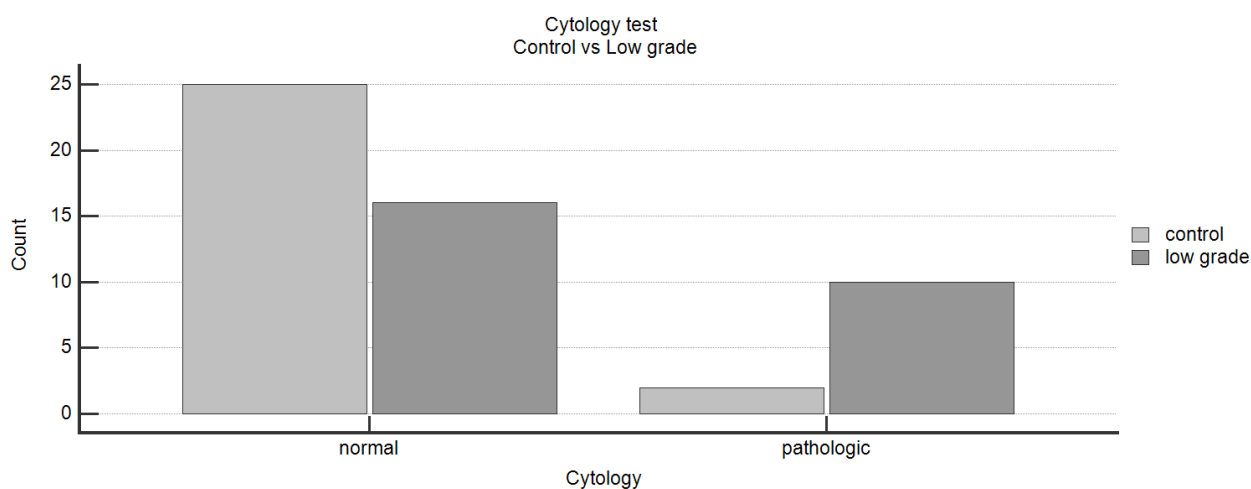
Senzitivita a specificita cytologie moči byla 66,7 %, respektive 92,6 % ( $p < 0,0001$ ). Při rozdělení nádorů na LG a HG karcinom byly výsledky srovnatelné s již publikovanými daty (senzitivita 38,5 %, respektive 86,5 %) (Tab. 17, 18, Graf 16, 17). Negativní prediktivní hodnota při detekci (dispenzarizaci) LG nádorů byla 61 %.

**Tab. 17. Analýza cytologie moči (LG nádory, Chí-kvadrát test).**

|          | Cytologie      |                |             |
|----------|----------------|----------------|-------------|
|          | PAP 1-2        | PAP 3-5        |             |
| Kontroly | 25             | 2              | 27 (54,0 %) |
| LG       | 16             | 10             | 26 (49,1 %) |
| Celkem   | 41<br>(77,4 %) | 12<br>(22,6 %) | 53          |

$p = 0,018$

**Graf 16. Grafické znázornění zastoupení cytologického nálezu (normal=PAP 1-2, pathologic=PAP 3-5) mezi kontrolami (control) a pacienty s LG nádory (low grade).**

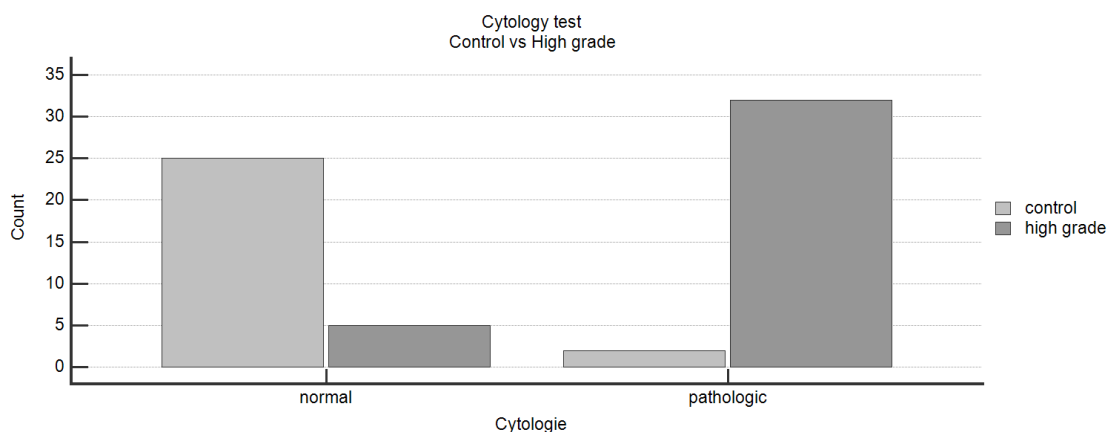


**Tab. 18. Analýza cytologie moči (HG nádory, Chí-kvadrát test).**

|          | Cytologie      |                |             |
|----------|----------------|----------------|-------------|
|          | PAP 1-2        | PAP 3-5        |             |
| Kontroly | 25             | 2              | 27 (40,3 %) |
| HG       | 5              | 32             | 37 (57,8 %) |
| Celkem   | 30<br>(46,9 %) | 34<br>(53,1 %) | 64          |

$p < 0,0001$

**Graf 17. Grafické znázornění zastoupení cytologického nálezu (normal=PAP 1-2, pathologic=PAP 3-5) mezi kontrolami (control) a pacienty s HG nádory (high grade).**



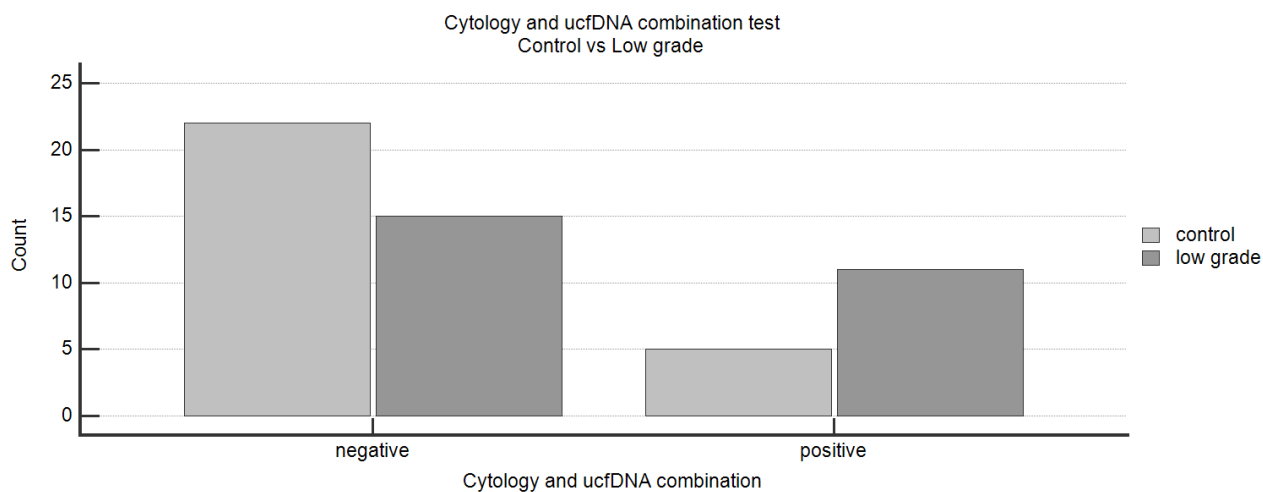
### *Kombinace cytologie moči a TA DNA*

Středem pozornosti byla analýza schopnosti TA DNA detekovat pacienty s nádory, kteří unikli pozornosti cytologie jakožto zlatého standardu v diagnostice. Kombinace TA DNA a cytologie moči přinesla pouze mírné zvýšení senzitivity na 42,3 % za cenu 3 nesprávně pozitivních výsledků (specifická testu 81,5 %,  $p = 0,11$ , NPV = 59,5 %) (Tab. 19, Graf 18). Naopak při diagnostice HG nádorů přinesla kombinace cytologie a TA DNA zvýšení senzitivity na 91,9 % při akceptovatelné specifické 81,5 % (Tab. 20, Graf 19).

**Tab. 19. Cytologie moči v kombinaci s TA DNA při detekci LG nádorů (Chí-kvadrát test) ( $p = 0,11$ ).**

|          | Cytologie a TA DNA |           |             |
|----------|--------------------|-----------|-------------|
|          | Negativní          | Pozitivní |             |
| Kontroly | 22                 | 5         | 27 (50,9 %) |
| LG       | 15                 | 11        | 26 (49,1 %) |
|          | 37                 | 16        | 53          |
|          | (69,8 %)           | (30,2 %)  |             |

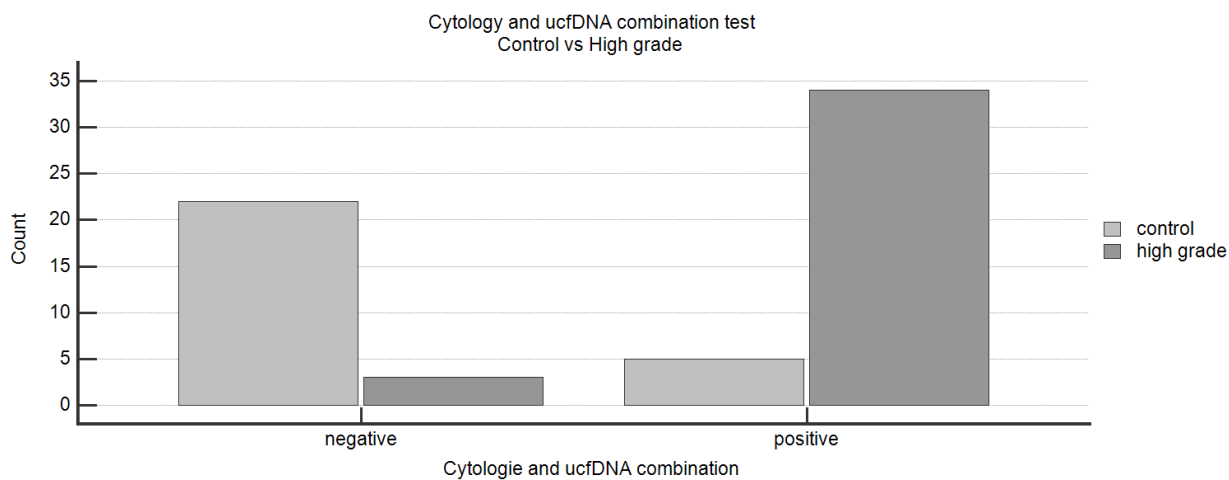
**Graf 18. Grafické znázornění kombinace cytologie a TA DNA (negative=oba testy negativní, positive=oba nebo alespoň jeden test pozitivní) mezi kontrolami (control) a pacienty s LG nádory (low grade).**



**Tab. 20. Cytologie moči v kombinaci s TA DNA při detekci HG nádorů (Chí-kvadrát test) ( $p < 0,0001$ ).**

| Cytologie a TA DNA |                |                |             |
|--------------------|----------------|----------------|-------------|
|                    | Negativní      | Pozitivní      |             |
| Kontroly           | 22             | 5              | 27 (42,2 %) |
| HG                 | 3              | 34             | 37 (57,8 %) |
| Celkem             | 25<br>(39,1 %) | 39<br>(60,9 %) | 64          |

**Graf 19. Grafické znázornění kombinace cytologie a TA DNA (negative=oba testy negativní, positive=oba nebo alespoň jeden test pozitivní) mezi kontrolami (control) a pacienty s HG nádory (high grade).**



### 3.5 Diskuze

Hladina ucfDNA je potenciální neinvazivní biomarker UK močového měchýře. Vzhledem k přímému kontaktu moči a nádoru je moč ideální

tělesná tekutina k jeho diagnostice. Potenciál ucfDNA ukázali již Zancan et al. (174), nicméně v následující studii výsledky nepotvrdili při použití různých metodologií kvantifikace volné DNA (146). Chang et al. koncentrace ucfDNA upravovali přepočtem na hladinu kreatininu v moči (147).

Cílem naší studie bylo prohloubit znalosti o chování cfDNA v moči u pacientů s různými stádii a stupni diferenciací UK močového měchýře, pacientů s benigním urologickým onemocněním a zdravých individuí. Zejména jsme chtěli optimalizovat kvantifikaci ucfDNA pomocí standardizované metodologie a analyzovat efektivitu ucfDNA v diagnostice UK močového měchýře.

Z metodologického hlediska bylo třeba rozhodnout, která porce moči je vhodná ke kvantifikaci volné DNA. První ranní moč není vhodná pro vyšetření cytologie pro vysoké procento cytolýzy buněk. Volná DNA je vcelku stabilní za různých experimentálních podmínek, nicméně není jasné, zda je tato stabilita ovlivněna déletrvajícím kontaktem s koncentrovanou močí (171). Náš předpoklad byl takový, že hladiny ucfDNA se budou lišit mezi první a druhou ranní močí a dále že celkové množství cfDNA bude korelovat s délkou kontaktu sliznice (nádoru) s močí. Srovnali jsme tedy koncentrace obou močí u 27 individuí s nádory měchýře a bez nádoru, a koncentrace v druhé porci byly významně vyšší. Zároveň však měly druhé moči významně nižší objemy. Kalkulací získané celkové množství volné DNA ( $c \times V$ ) se v obou močích nelišilo. Znamenalo to, že se do moči dostane určité množství volné DNA, které se naředí v určitém objemu moči. Regresní analýzou jsme prokázali logaritmickou závislost koncentrace na objemu a celkové množství volné DNA jsme tedy vyhodnotili jako vhodný biomarker. Jako optimální odběr ke kvantifikaci volné DNA jsme zvolili druhou ranní moč vzhledem ke standardnímu vyšetřování cytologie moči a dále ke sjednocení doby kontaktu sliznice s močí. Hladina kreatininu moči

se liší mezi pohlavími, závisí na individuálním metabolismu, příjmu tekutin, pocení apod. a není tedy tak exaktní veličinou ke kvantifikaci volné DNA jako objem, do kterého se volná DNA vyloučí bez ohledu na koncentrovanost moči.

Při porovnání TA DNA PACIENTŮ a KONTROL (zdraví dobrovolníci a pacienti s benigním urologickým onemocněním) byly nalezeny významně vyšší hladiny u pacientů s nádory. Při rozdělení kontrol na dvě zmíněné skupiny však rozdíly mezi pacienty s nádory a pacienty s benigním onemocněním nalezeny nebyly. Stratifikací pacientů s nádory na nízká stádia pTa a vyšší stádia pT1-4 naopak rozdíly mezi pacienty s benigním onemocněním a pacienty s vyššími stádii nádory nalezeny byly, zatímco pacienti s nádory pTa se nelišili jak od zdravých dobrovolníků, tak od pacientů s benigním onemocněním. Navíc se lišili od pacientů s vyššími stádii. Zdá se tedy, že TA DNA koreluje s obecně jakýmkoli, ať už benigním, procesem v močovém měchýři a se stádiem nádoru. Stejný poznatek byl získán analýzou pacientů s LG a HG nádory, což se dalo očekávat, protože většinu nádorů stádia pTa měla nízké stupně diferenciacie buněk (LG). Výpočtem optimální cut-off hodnoty TA DNA byla získána nejlepší senzitivita k detekci nádoru stádia pT1-4 (62,5 %) a HG nádoru (59,5 %) při specificitě 91,2 %, což nedosahuje efektivity cytologie moči (senzitivita 89,5 %, specificita 92,6 %).

Zajímavý byl pohled na kombinaci obou markerů (TA DNA a cytologie moči). Senzitivita cytologie pro detekci LG nádorů je nízká. Nádory LG tvořily 44 % souboru, většina stádia pTa (72 %). Kombinací obou markerů se senzitivita nevýznamně zvýšila z 38,5 % na 42,3 %. Při sledování pacientů s LG nádory je potřeba zejména snížit počty dispenzárních cystoskopií použitím testu s dobrou negativní prediktivní hodnotou, protože „přehlédnutím“ takového nádoru se prognóza pacienta nezhorší. Ani v tomto ohledu kombinace obou testů zlepšení nepřinesla (negativní prediktivní

hodnota 59,5 %). Časná detekce HG nádoru při sledování pacientů s UK má naopak zásadní význam pro prognózu onemocnění. Cytologie moči je v tomto ohledu zlatým standardem, slouží však jako komplement cystoskopie. V našem souboru jsme dosáhli kombinací TA DNA a cytologie senzitivity 91,9 %.

Hlavní limitací studie je jednoznačně kompozice subjektů v souboru. Vzhledem ke zjištění souvislosti hladiny TA DNA s přítomností benigního onemocnění močového měchýře by bylo vhodnější vyšší zastoupení kontrol s těmito diagnózami, protože k vyšetření na urologii přichází pacient s určitými klinickými obtížemi. Pro vyšetřování zdravé populace test vzhledem k ceně a laboratorní náročnosti v současné době vhodný není. Další limitací je vysoké zastoupení pacientů s nádory (66 %), což může přeceňovat senzitivitu testu.

### **3.6 Závěry**

Naše práce vnesla více světla do problematiky volné DNA v moči při neinvazivní diagnostice UK močového měchýře.

1. Standardizovaným odběrem moči a výpočtem celkového množství volné DNA jsme optimalizovali kvantifikaci volné DNA. Výsledky je třeba validovat na větším souboru pacientů.
2. Hladina TA DNA koreluje se stádiem onemocnění.
3. Hladina TA DNA se neliší mezi kontrolami a pacienty se stádii pTa a LG nádory. TA DNA není vhodný biomarker k detekci a monitorování těchto nádorů ani v kombinaci s cytologií moči.
4. Hladina TA DNA má relativně dobrou efektivitu při detekci nádorů s vyšším rizikem a zejména v kombinaci s cytologií moči lze dosáhnout dobré senzitivity. Tyto výsledky je třeba validovat na větším souboru pacientů s vhodně definovaným designem studie.

## **4. MicroRNA v moči pacientů jako neinvazivní biomarker k detekci uroteliálního karcinomu močového měchýře**

### **4.1 Hypotézy a cíle práce**

Micro RNA jsou krátké nekódující molekuly RNA, které hrají klíčovou roli v onkogenezi a progresi nádoru. Jako takové jsou zkoumány v souvislosti s neinvazivní detekcí a prognózou UK močového měchýře. Existují data získaná na základě studií zkoumajících exprese miRNA v nádoru a zdravé tkáni, močového supernatantu i celé moči (viz kapitola 2.4.5 a Tab. 10). Hlavním cílem naší studie byla analýza profilů miRNA v supernatantu moči pacientů s různými stádii UK močového měchýře a stupni buněčné diference a srovnání jejich exprese s expresí miRNA získanými z moči kontrolních subjektů. Předpokládali jsme, že na základě těchto profilů bude možno navrhnout konkrétní miRNA nebo jejich kombinace, které umožní neinvazivní diagnostiku UK močového měchýře.

#### *Konkrétní hlavní cíle studie*

1. Pomocí metod molekulární biologie získat profil miRNA v supernatantu moči pacientů a kontrol a určit konkrétní miRNA, jejichž exprese rozliší obě skupiny.
2. Potvrdit získané výsledky pomocí přesnější metody molekulární biologie.
3. Validovat získané výsledky na kohortě nových pacientů a kontrol.
4. Pokusit se určit efektivitu těchto markerů při detekci různých stádií onemocnění tak, aby mělo jejich použití klinický význam.
5. Pomocí kombinací těchto miRNA stanovit vhodný algoritmus k dosažení nejlepší senzitivity a specifity při detekci UK močového měchýře.



## 4.2 Materiál a metodika

V období 5/2012 – 6/2015 byly postupně odebrány vzorky moči od 109 probandů. Charakteristika souboru je uvedena v Tab. 21. Byla použita druhá ranní moč, získaná přibližně 2 hodiny po předchozí mikci. 50ml moči spolu s 1,5ml RNA lateru (Ambion, Life technologies, NY, USA) bylo centrifugováno rychlostí 4000 otáček/min po dobu 10 minut při teplotě 10°C. Získaný supernatant byl poté zamrazen na -20°C.

Pacienti s UK močového měchýře podstoupili TUR nebo radikální cystektomii a stádium onemocnění a stupeň buněčné diferenciacce byly určeny histopatologem (WHO 2004).

**Tab. 21. Charakteristika souboru pacientů vyšetřených v první a druhé části studie (iniciační a verifikační fáze).**

|          | N  | Věk<br>(průměr) | Muži | Ženy |                     | N  |
|----------|----|-----------------|------|------|---------------------|----|
| Kontroly | 13 | 29-80<br>(54,8) | 8    | 5    | Zdraví dobrovolníci | 13 |
| Pacienti | 46 | 41-86<br>(67,9) | 32   | 14   | LG                  | HG |
| Celkem   | 59 |                 | 40   | 19   | pTa                 | 8  |
|          |    |                 |      |      | pT1                 | 7  |
|          |    |                 |      |      | pT2                 | 0  |
|          |    |                 |      |      | pT3                 | 0  |
|          |    |                 |      |      | pT4                 | 0  |

Studie se skládala ze 3 částí:

1. V první části (iniciační fáze) byl vyšetřen supernatant u 59 probandů pomocí technologie array (Tab. 21).

2. Ve druhé části studie (verifikační fáze) byly analyzovány miRNA vyselektované v iniciační fázi pomocí single-target qPCR assay u stejné skupiny pacientů a kontrol.

3. Ve třetí části studie (validační fáze) byly získané výsledky potvrzeny na souboru 50 nových probandů (jejich charakteristika je uvedena v Tab. 22). Deset miRNA vyselektovaných v předchozích 2 fázích studie bylo opět analyzováno pomocí single-target qPCR assay.

**Tab. 22. Charakteristika souboru pacientů vyšetřených v třetí části studie (validační fáze).**

|          | N  | Věk<br>(průměr) | Muž | Žena |                     |    | N  |    |
|----------|----|-----------------|-----|------|---------------------|----|----|----|
| Kontroly | 23 | 50-81<br>(66,5) | 17  | 6    | Zdraví dobrovolníci |    | 18 |    |
|          |    |                 |     |      | Benigní onemocnění  |    | 5  |    |
| Pacienti | 27 | 62-76<br>(68,1) | 24  | 3    | LG                  | HG |    |    |
| Celkem   | 50 |                 | 41  | 9    | pTa                 | 15 | 0  | 15 |
|          |    |                 |     |      | pT1                 | 0  | 7  | 7  |
|          |    |                 |     |      | pT2                 | 0  | 5  | 5  |

### *Izolace miRNA*

Ve všech fázích studie byl použit stejný protokol izolace miRNA. Zamrazené vzorky supernatantu byly rozmrazeny v pokojové teplotě a objem 1ml byl použit k izolaci volných miRNA. Izolace proběhla pomocí Urine microRNA Purification Kit (NORGEN BIOTEK CORPORATION, Kanada) podle doporučení výrobce. Purifikované miRNA byly okamžitě připraveny k reverzní transkripci.

### *Reverzní transkripce*

V iniciační fázi studie byla reverzní transkripce provedena pomocí protokolu TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit s primery Megaplex<sup>™</sup> RT, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA). Reakce probíhala ve Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>™</sup>, Germany).

Ve druhé a třetí fázi studie byl k reverzní transkripci použit protokol TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit s TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA) opět ve Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>™</sup>, Germany). Získaná cDNA byla okamžitě zmrazena na -20°C.

### *Preamplifikace*

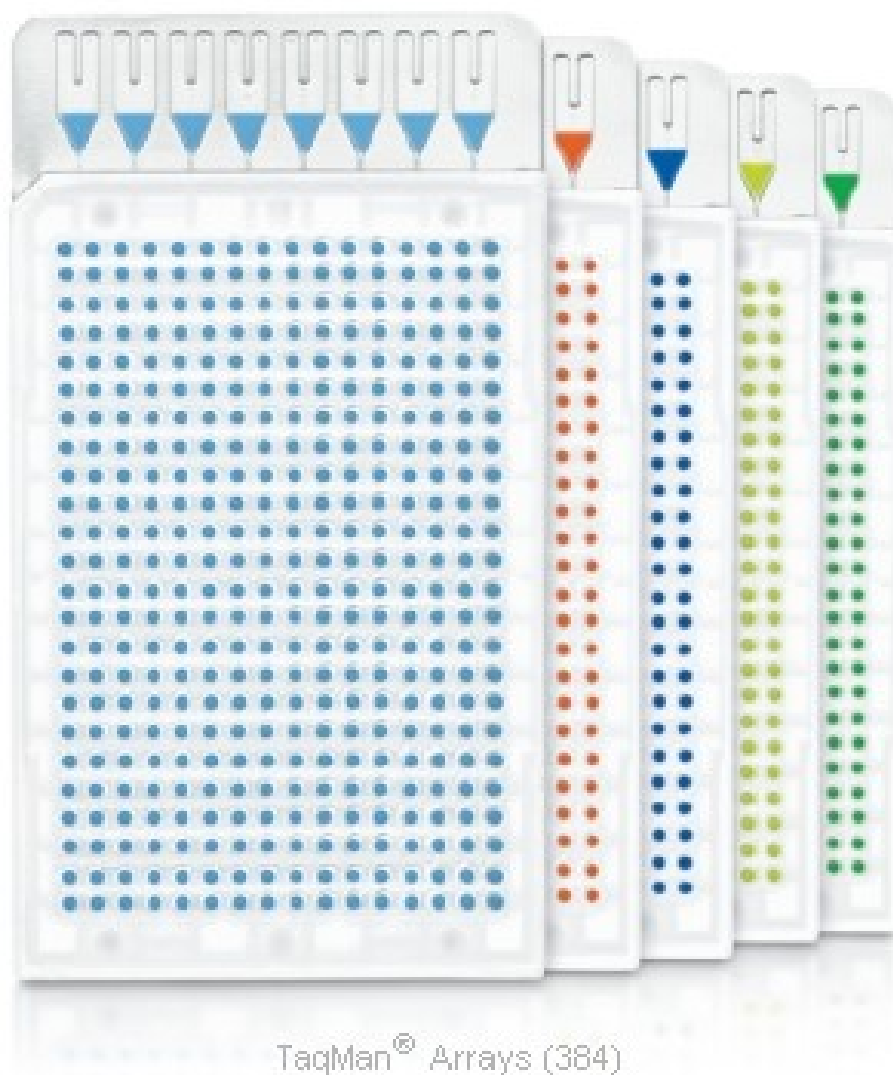
Tento krok byl použit pouze v iniciační fázi studie. Po rozmrazení byla cDNA preamplifikována podle protokolu TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Preamplification s primery Megaplex<sup>™</sup> PreAmp, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA) ve Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>™</sup>, Germany). Vzorby byly poté okamžitě použity do Real-Time PCR bez jakéhokoli ředění.

### *Analýza cDNA v array destičkách*

Vzorby preamplifikované cDNA byly naneseny na TaqMan<sup>®</sup> Array Human MicroRNA Card A v.2.1 (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA).

Následovala PCR na array destičkách, která proběhla v 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA) (Obr. 2).

**Obr. 2. Destička TaqMan MicroRNA Array. Reverzní transkripce probíhá v jedné zkumavce pro všechny miRNA najednou. Následuje preamplifikace cDNA a poté PCR na kartě, kde je 384 jamek. Každá jamka obsahuje 1  $\mu$ l reakční směsi. Tato metoda je méně přesná než TaqMan MicroRNA Assays.**

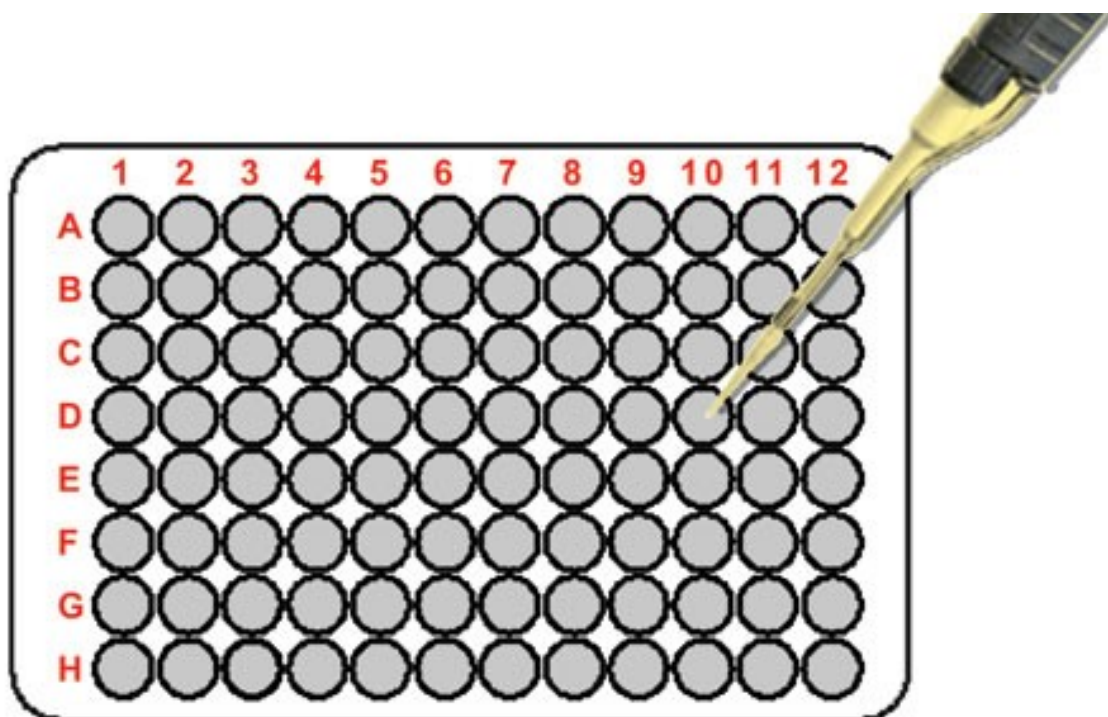


### *Analýza micro RNA pomocí single-target qPCR assays*

Ve verifikační a validační fázi studie byla použita single TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA). Amplifikace proběhla v celkovém objemu 14 $\mu$ l reakční směsi, která obsahovala 3.2 $\mu$ l

nuclease-free aqua pro injection (Fresenius Kabi, Česká republika), 8 $\mu$ l TaqMan<sup>®</sup> UNIVERSAL MasterMix II, UNG (uracyl N-glykosyláza) (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA), 0.8 $\mu$ l TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA) spolu s 4 $\mu$ l cDNA. PCR proběhla na destičkách v 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems<sup>™</sup>, CA, USA) (Obr. 2).

**Obr. 3. TaqMan MicroRNA Assays. Jedná se o 96jamkové destičky. Reverzní transkripce probíhá zvlášť pro každou miRNA v samostatné zkumavce. Preaplimfikace cDNA není třeba. PCR probíhá na destičce, kde v každé jamce je 15  $\mu$ l reakční směsi.**



### *Statistická analýza*

Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu ExpressionSuite Software v1.0.3 (Applied Biosystems<sup>TM</sup>, CA, USA), qBase<sup>+©</sup> v2.4 (Biogazelle, Belgie), Statistica software version 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) a software G\*Power version 3.1.9.2 (Franz Faul, Universität Kiel, Germany). Tři miRNA (miR-191, miR-28-3p and miR-200b), vybrané geNorm analýzou v programu qBase<sup>+©</sup> v2.4 (Biogazelle, Belgie) na základě profilu miRNA celého souboru (array PCR), byly použity pro normalizaci exprese jednotlivých miRNA ve všech fázích studie. Ke statistickému porovnání exprese miRNA mezi kontrolami a pacienty byl použit Man-Whitney U test s Benjamini-Hochberg korekcí. K určení efektivní velikosti souboru při analýze jednotlivých miRNA ve validační fázi studie byl použit G\*Power software, ve kterém byly zohledněny výsledky získané ve druhé fázi studie. Předpokladem byla alespoň dvojnásobná exprese miRNA u jedné z porovnávaných skupin oproti druhé skupině.

K analýze senzitivity a specificity jednotlivých miRNA získaných ve validační fázi studie byl pro získání kombinace s nejlepší diagnostickou účinností použit rozhodovací algoritmus provedený softwarem Waikato Environment for Knowledge Analysis (Weka) software (University of Waikato, Nový Zéland).

### *Bioinformační analýza*

Pro vybrané miRNA byla provedena analýza jejich ověřených cílů za použití miRWalk databáze (175). Příslušné cílové skupiny genů byly pak analyzovány a porovnány pomocí Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (176, 177) dle jejich funkcí s použitím Benjaminiho korekce.

## 4.3 Výsledky

### 4.3.1 Iniciační fáze

V iniciační fázi bylo vyšetřeno celkem 381 miRNA. Cílem bylo vybrat vhodné miRNA z co největšího poolu dostupných miRNA k dalším analýzám. Porovnali jsme profily miRNA pacientů s nádory a kontrol. Normalizace byla provedena proti průměru hladin 3 vybraných miRNA (viz *Materiál a metodika*) a navíc proti globálnímu průměru hladin jednotlivých miRNA z celého datasetu. Signifikantní rozdíly vykazovaly exprese 13 miRNA (Tab. 23).

**Tab. 23. Výsledky první, iniciační fáze studie (analýza microarray).**

|            | Normalizace proti vybraným miRNA (miR-191, miR-28-3p and miR-200b) |                                 | Normalizace proti globálnímu průměru |                                 |
|------------|--|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
|            | Hodnota p  | Násobek (kontroly vs. pacienti) | Hodnota p                            | Násobek (kontroly vs. pacienti) |
| miR-99a    | 0,0001   | 12,51                           | 0,0069                               | 4,30                            |
| let-7c     | 0,0002   | 8,02                            | 0,0157                               | 2,76                            |
| miR-125b   | 0,0003   | 14,71                           | 0,0085                               | 5,06                            |
| miR-532-3p | 0,0008   | 7,49                            | 0,0221                               | 2,58                            |
| miR-30b    | 0,0009   | 6,34                            | 0,0476                               | 2,18                            |
| miR-16     | 0,0011   | 0,17                            | 0,0004                               | 0,06                            |
| miR-204    | 0,0021   | 8,85                            | 0,0375                               | 3,04                            |

|             |        |      |        |      |
|-------------|--------|------|--------|------|
| miR-425     | 0,0042 | 0,14 | 0,0015 | 0,05 |
| miR-93      | 0,0388 | 0,46 | 0,0015 | 0,18 |
| miR-372     | 0,1968 | 0,04 | 0,1455 | 0,02 |
| miR-519a    | 0,3395 | 0,25 | 0,1339 | 0,11 |
| miR-301a    | 0,4106 | 0,57 | 0,0520 | 0,25 |
| miR-199a-3p | 0,5229 | 0,21 | 0,1192 | 0,09 |

#### 4.3.2 Verifikační fáze

Do druhé, verifikační fáze studie, bylo vzato 13 miRNA s nejnižší p hodnotou, určených nezávisle oběma normalizačními metodami (Tab. 23). Výsledky byly verifikovány pomocí single-target qPCR assays. K normalizaci byly opět použity 3 výše zmíněné miRNA stanovené pomocí geNorm analýzy. Z 13 miRNA jsme potvrdili statisticky významné rozdíly expresí mezi kontrolami a pacienty celkem u 10 z nich (Tab. 24, Graf 20).

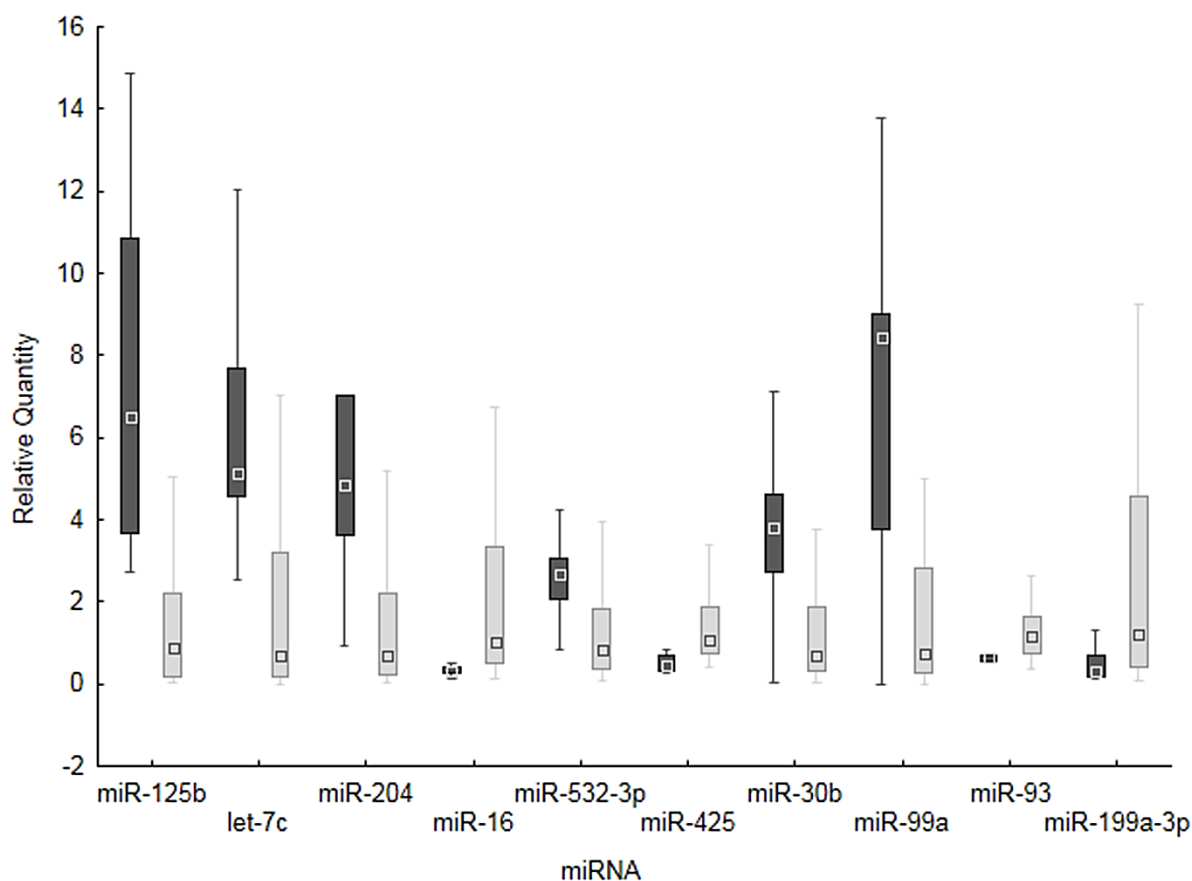
**Tab. 24. Výsledky druhé, verifikační fáze studie založené na single target assay.**

|            | Hodnota p | Násobek<br>(kontroly vs. pacienti) |
|------------|-----------|------------------------------------|
| miR-125b   | <0.0001   | 11,77                              |
| let-7c     | <0.0001   | 9,18                               |
| miR-204    | 0,0002    | 7,99                               |
| miR-16     | 0,0002    | 0,23                               |
| miR-532-3p | 0,0002    | 3,19                               |
| miR-425    | 0,0002    | 0,42                               |



|             |        |      |
|-------------|--------|------|
| miR-30b     | 0,0005 | 3,60 |
| miR-99a     | 0,0006 | 6,09 |
| miR-93      | 0,0006 | 0,54 |
| miR-199a-3p | 0,0060 | 0,30 |

**Graf 20. Krabicové grafy demonstrující rozdíly mezi pacienty a kontrolami v expresi jednotlivých miRNA ze signifikantními rozdíly (verifikační fáze). Mediány jsou znázorněny pomocí čtverců; obdélníky vyznačují 25. a 75. percentily; tmavě šedé sloupce jsou exprese miRNA u kontrol; světle šedé sloupce u pacientů s UK močového měchýře.**



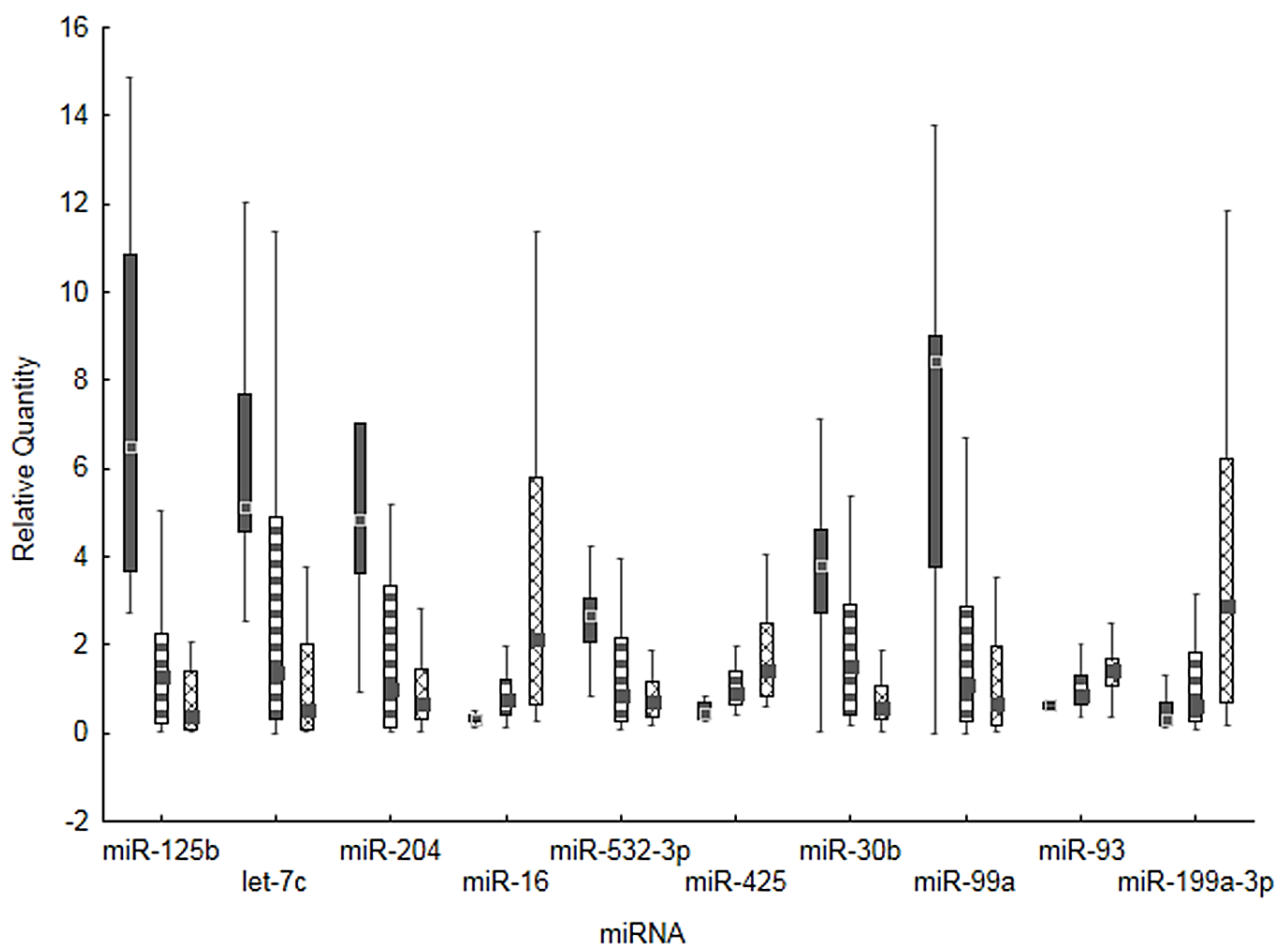
### *Rozdělení pacientů podle infiltrace do detruzoru*

V rámci verifikační fáze jsme testovali pomocí Kurkal-Wallisova testu rozdíly v hladinách 10 vyselektovaných miRNA mezi kontrolami, pacienty s NMIBC (nádory pTa a pT1 = 22 pacientů) a pacienty s MIBC (nádory pT2-4 = 24 pacientů). Opět byla použita single-target qPCR assay. Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány v porovnání kontrol s oběma skupinami nádorů (až na jednu výjimku), nikoli však mezi oběma skupinami nádorů navzájem (Tab. 25, Graf 21).

**Tab. 25. Výsledky verifikační fáze studie založené na rozdělení nemocných s nádory mezi NMIBC a MIBC.**

|             | Hodnota p          |                   |                |
|-------------|--------------------|-------------------|----------------|
|             | Kontroly vs. NMIBC | Kontroly vs. MIBC | NMIBC vs. MIBC |
| miR-125b    | 0,0015             | <0,0001           | 0,45           |
| let-7c      | 0,0032             | <0,0001           | 0,36           |
| miR-204     | 0,0020             | 0,0002            | 1              |
| miR-16      | 0,0203             | <0,0001           | 0,14           |
| miR-532-3p  | 0,0051             | 0,0003            | 1              |
| miR-425     | 0,0198             | <0,0001           | 0,21           |
| miR-30b     | 0.0454             | 0.0001            | 0.1853         |
| miR-99a     | 0.0154             | 0.0009            | 1              |
| miR-93      | 0.0475             | 0.0003            | 0.2782         |
| miR-199a-3p | 0.3833             | 0.0012            | 0.0607         |

**Graf 21. Krabicové grafy demonstrující rozdíly mezi kontrolami, pacienty s NMIBC a pacienty s MIBC v expresi jednotlivých miRNA vyselektovaných ve verifikační fázi studie. Mediány jsou znázorněny pomocí čtverců; obdélníky vyznačují 25. a 75. percentily; tmavě šedé sloupce jsou exprese miRNA u kontrol, šrafované sloupce u pacientů s NMIBC a sloupce s křížky u pacientů s MIBC.**



#### 4.3.3 Validací fáze

Cílem třetí fáze studie bylo validovat výsledky verifikační fáze na souboru nových pacientů a kontrol. Pomocí power analýzy byl stanoven nutný minimální počet 7 – 21 probandů v každé skupině (kontroly X pacienti) pro testování každé z 10 miRNA. Nový soubor byl tedy dostatečně silný k získání validních výsledků, navíc bylo mezi kontroly přidáno 5 pacientů s

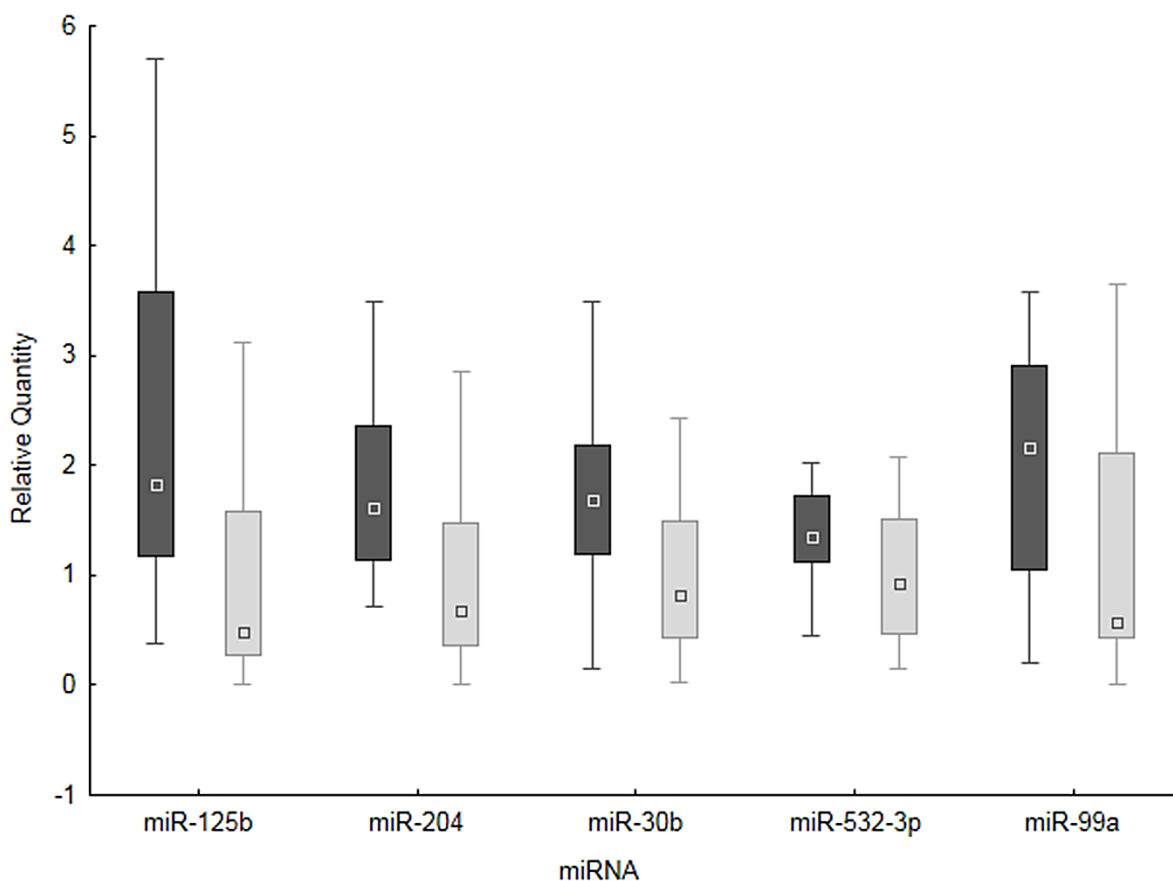
benigním urologickým onemocněním (Tab. 22). Na těchto nových sériích vzorků jsme potvrdili signifikantní rozdíly mezi kontrolami a pacienty v expresích následujících miRNA: miR-125b, miR-30b, miR-204, miR-99a a miR-532-3p. Všech 5 výše uvedených miRNA bylo down-regulováno v supernatantu pacientů s UK močového měchýře. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 26 a ilustrovány grafem 22. V hladinách miR-99a a miR-125b byla nalezena významná korelace ( $r=0,89$ ), a proto byly potvrzené cíle zmíněných dvou miRNA podrobeny bioinformační analýze k získání informací o úloze těchto genových skupin v regulaci buněčného cyklu a nádorového růstu (Tab. 27). Výsledky naznačují, že obě miRNA jsou schopny regulovat rozsáhlé sady genů majících zásadní vliv na tumorigenezi, zejména nádorů močového měchýře.

Naším cílem bylo vytvořit ideální kombinaci těchto 5 miRNA k získání vhodného diagnostického biomarkeru. Pomocí softwaru Weka byla provedena kombinovaná analýza jednotlivých senzitivit, specifit a AUC. Nejlepší algoritmus byl založen na kombinaci miR-125b, miR-204, miR-532-3p a miR-99a, který dosahoval senzitivity 80 % a specifity 71 % (AUC 0,836).

**Tab. 26. Výsledky třetí, validační fáze studie.**

|            | Hodnota p | Násobek<br>(kontroly vs.<br>pacienti) | Senzitivita<br>(%) | Specifita<br>(%) | AUC   | Cut-off<br>hodnota |
|------------|-----------|---------------------------------------|--------------------|------------------|-------|--------------------|
| miR-125b   | <0,0001   | 3,50                                  | 59,3               | 95,7             | 0.801 | ≤0,618             |
| miR-204    | 0,0001    | 3,00                                  | 53,9               | 100              | 0.771 | ≤0,703             |
| miR-99a    | 0,0019    | 2,67                                  | 74                 | 82,6             | 0.738 | ≤1,003             |
| miR-30b    | 0,0002    | 2,10                                  | 66,7               | 82,6             | 0.760 | ≤1,115             |
| miR-532-3p | 0,0031    | 1,64                                  | 59,3               | 87               | 0.718 | ≤1,002             |

**Graf 22. Krabicové grafy demonstrující rozdíly mezi pacienty a kontrolami v expresi jednotlivých miRNA ze signifikantními rozdíly (validační fáze). Mediány jsou znázorněny pomocí čtverců; obdélníky vyznačují 25. a 75. percentily; tmavě šedé sloupce jsou exprese miRNA u kontrol; světle šedé sloupce u pacientů s UK močového měchýře.**



**Tab. 27. „Top“ termíny vybrané pomocí DAVID, identifikované analýzou 256 genů regulovaných buď miR-99a nebo miR-125b.**

| Termín                                  | Hodnota p po Benjaminiho korekci | Počet genů |
|---|----------------------------------|------------|
| Regulace apoptózy                       | $1,8 \times 10^{-22}$            | 64         |
| Regulace transkripce RNA polymerazou II | $6,5 \times 10^{-23}$            | 62         |
| Odpověď na organické substance          | $1,4 \times 10^{-16}$            | 52         |
| Odpověď na stimuly steroidních hormonů  | $1,9 \times 10^{-13}$            | 26         |

|   |                       |    |
|---|-----------------------|----|
| Odpověď na organické cyklické substance | $3,5 \times 10^{-6}$  | 14 |
| Regulace spojování DNA                  | $1,2 \times 10^{-13}$ | 22 |
| Nádor močového měchýře                  | $4,3 \times 10^{-11}$ | 15 |
| Novotvorba krevních cév                 | $2,2 \times 10^{-5}$  | 18 |

---

#### 4.4 Diskuze

MicroRNA mají zásadní vliv na proces buněčné transformace a růstu tím, že blokují proces translace mechanismem založeným na komplementaritě s cílovou mRNA (178). Tím se z nich stávají potenciální biomarkery nejen k detekci neoplázie, ale i ke stanovení prognózy u konkrétního pacienta určitého stadia onemocnění a tedy volbě adekvátní léčby.

Prvním aspektem jejich výzkumu je, stejně jako u ucfdDNA, zvolená metodologie. Vzhledem k nutnosti provedení několika kroků včetně reverzní transkripce je stanovení jejich profilu a “kvantity” poměrně složité. Standardizace metodologie je tedy pro jejich zavedení do klinické praxe klíčová.

Pro stanovení exprese miRNA se používá normalizace dat k endogenním kontrolám, tedy stanovení jejich relativního podílu v tělesné tekutině. Tradičně používané endogenní kontroly, jako U6 nebo RNU6B (Tab. 10), nejsou univerzálně použitelné pro všechny tkáně a tělesné tekutiny (179, 180). Pro účely normalizace hladin miRNA v močovém supernatantu nejsou stanoveny ideální normalizátory. V naší studii jsme tedy využili analýzu geNorm v programu qBase<sup>+</sup>, který je k jejich hledání široce využíván. Analýzou micro-array supernatantu moči celého datasetu byly stanoveny 3

miRNA (miR-191, miR-28-3p a miR-200b), jejichž kvantita byla nejrovnoměrnější.

V pilotní (iniciační) fázi studie jsme pomocí array technologie stanovili základní profil miRNA v moči kontrol a pacientů a 13 miRNA se signifikantními rozdíly v expresi jsme verifikovali pomocí single-target qPCR assay na stejné kohortě probandů. Po verifikaci 10 miRNA jsme tyto výsledky validovali na novém souboru probandů s rovnoměrnějším zastoupením pacientů a kontrol, který zahrnoval také pacienty s benigním urologickým onemocněním a naopak nezahrnoval pacienty s nejvyššími stádii onemocnění (pT3, pT4). Takto jsme našli 5 miRNA, jejichž exprese byly signifikantně sníženy v supernatantu moči pacientů s UK močového měchýře, a to miR-125b, miR-204, miR-99a, miR-30 b a miR-532-3p.

Při studiu dostupné literatury lze najít částečné shody s jinými autory, i když použitá metodologie se mezi studii liší, zejména normalizací hladin miRNA. Ve studii Zhanga et al. byly miR-125b a miR-99a down-regulovány v supernatantu moči pacientů a tkáni nádoru (156). Snowdon et al. prokázali down-regulaci miR-125b v supernatantu moči pacientů s LG a HG nádory a v porovnání s cytologií moči vykazovaly tyto markery (miR125b spolu s miR-126) vyšší diagnostickou přesnost než cytologie moči (168). Stejně tak byla prokázána down-regulace miR-99a v buněčných liniích, nádorové tkáni a plazmě (166) a také down-regulace miR-204 v buněčných liniích UK močového měchýře, nádorové tkáni a sedimentu moči (162). I když se jednalo o pilotní studie s malým počtem probandů, výsledky jsou povzbudivé a opravňují realizaci klinických studií s většími počty probandů a přesně definovanými klinickými cíli a potřebnou dobou sledování.

Funkce miRNA miR-125b byla zkoumána ve studiích, kde byl transfekcí této miRNA do nádorových buněčných linií inhibován jejich růst. Autoři studie dokonce našli potenciální cíl miR-125b, a to onkogen E2F3, jehož translace na cílový protein byla inhibována (181). Další výzkum zaměřený

na přesné rozklíčování tohoto regulačního komplexu umožní lépe porozumět roli miRNA v kancerogenezi UK a definovat jejich možné užití jako biomarkeru, ať již diagnostického nebo prognostického.

V naší studii jsme prokázali rozdíly v expresích pěti miRNA mezi kontrolami a pacienty na daleko větším počtu probandů než ve výše uvedených studiích, a následně jsme výsledky validovali na novém souboru. Pohled na diagnostickou přesnost jednotlivých miRNA (Tab. 26) a jejich kombinací naznačuje, že v této oblasti mohou některé miRNA v budoucnu hrát významnou roli i přes nákladnou a pracnou metodologii.

Důležité však je přesně definovat klinickou situaci, za které lze tyto biomarkery využít. V naší studii jsme bohužel nebyli schopni – vzhledem k velikosti souboru – provést analýzy pro jednotlivá stadia onemocnění, nicméně jsme ve verifikační fázi studie prokázali významné rozdíly v expresích nejen mezi kontrolami a MIBC, ale i kontrolami a NMIBC (Tab. 23). Na druhou stranu rozdíly mezi oběma klinicky odlišnými skupinami nádorů zjištěny nebyly. Skupina NMIBC sice obsahovala pouze 8/22 (36 %) LG nádorů, avšak podrobnější analýza zaměřená na stupně diferenciac buněk nebyla možná. Ve validační fázi studie jsme se zaměřili na “nižší” stadia onemocnění, ve kterých nejčastěji recidivují nádory močového měchýře při dispenzarizaci. Soubor tvořilo pouze 5/27 (18,5 %) pacientů s nádory pT2, zbytek pacienti s NMIBC, z nichž 15/27 (56 %) byly LG nádory. Výsledky naznačují schopnost těchto neinvazivních biomarkerů odlišit nižší stadia onemocnění od kontrolních probandů. V budoucnu bude nutné standardizovat metodologii (zejména volbu normalizačních kontrol) a přesně definovat klinickou otázku, na které postavit prospektivní validační studie s dostatečným počtem kontrol a pacientů příslušného stadia, stupně buněčné diferenciac, pohlaví ap.

Limitací naší studie je zejména nerovnoměrnost zastoupení kontrol a pacientů mezi verifikační a validační fází studie a pak nerovnoměrnost



zastoupení kontrol a pacientů ve fázích samotných. Ve validační fázi již byl poměr kontrol a pacientů sice téměř 1:1, nicméně klinicky významných kontrol (pacienti s benigním urologickým onemocněním) bylo pouze 22 %.

#### **4.5 Závěry**

1. Vyšetřením exprese 381 miRNA jsme u 13 z nich detekovali významné rozdíly mezi pacienty s UK močového měchýře a kontrolami. Výsledky byly verifikovány na stejném souboru probandů pomocí metodologie zaměřené na specifické miRNA a rozdíly byly tímto způsobem potvrzeny u 10 miRNA.
2. Ve verifikační fázi studie byly zjištěny významné rozdíly v expresích 9 miRNA mezi kontrolami a pacienty s NMIBC a v expresích všech 10 miRNA mezi kontrolami a pacienty s MIBC.
3. Výsledky verifikační fáze byly validovány ve třetí části studie na novém souboru celkem 50 probandů. Rozdílná exprese byla signifikantní u 5 miRNA: miR-125b, miR-30b, miR-204, miR-99a a miR-532-3p. Všech 5 miRNA bylo down-regulováno u pacientů s nádory. U většiny z nich panuje shoda s již publikovanými pracemi a většina z nich hraje významnou roli při regulaci buněčného růstu a kancerogenezi NMM.
4. Nejlepší kombinací k diagnóze UK močového měchýře jsou miR-125b, miR-204, miR-99a a miR-532-3p. Tato kombinace dosahuje v ROC analýze sensitivity 80 % při specificitě 71 % a AUC 0,836.

## 5. Literatura

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2013. 2015.
2. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, 2013. 63: 234.
3. Sievert KD, Amend B, Nagele U, et al. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World J Urol* 2009;27: 295–300.
4. Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 2009;27:289–93.
5. Mužík J, Dušek L, Babjuk M, Kubásek M, Fínek J, Petruželka L. Uroweb – webový portál pro analýzu a vizualizaci epidemiologie, diagnostiky a léčby urologických malignit [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2018. [cit. 2018-05-28]. Dostupný z WWW: <http://www.uroweb.cz>. ISSN 1804-6371. Verze 1.6d.
6. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2018-5-28]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
7. Figueroa JD, Ye Y, Siddiq A, et al. Genome-wide association study identifies multiple loci associated with bladder cancer risk. *Hum Mol Genet*, 2014. 23: 1387.
8. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*, 2011. 306: 737.
9. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*, 2000. 86: 289.
10. Lammers RJ, Witjes WP, Hendricksen K, Caris CT, Janzing-Pastors MH, Witjes JA. Smoking status is a risk factor for recurrence after transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):713-20.

11. Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, et al. Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. *World J Urol.* 2011 Aug;29(4):457-63.
12. Palou J, Sylvester RJ, Faba OR, et al. Female gender and carcinoma in situ in the prostatic urethra are prognostic factors for recurrence, progression, and disease-specific mortality in T1G3 bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol.* 2012 Jul;62(1):118-25.
13. Liu S, Yang T, Na R, et al. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27,912 patients. *Int Urol Nephrol.* 2015. 47: 951.
14. Dietrich K, Demidenko E, Schned A, Zens MS, Heaney J, Karagas MR. Parity, early menopause and the incidence of bladder cancer in women: a case-control study and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2011. 47: 592.
15. Cohn JA, Vekhter B, Lyttle C, Steinberg GD, Large MC. Sex disparities in diagnosis of bladder cancer after initial presentation with hematuria: a nationwide claims-based investigation. *Cancer.* 2014. 120: 555.
16. Colt JS, Friesen MC, Stewart PA, et al. A case-control study of occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med.* 2014. 71: 667.
17. Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol.* 2005. 174: 107.
18. Salem HK, Mahfouz S. Changing patterns (age, incidence, and pathologic types) of schistosoma-associated bladder cancer in Egypt in the past decade. *Urology.* 2012. 79: 379.
19. American Cancer Society. *Cancer facts and figures 2006.* Atlanta, Georgia: American Cancer Society; 2006.
20. Dvořáček J, Babjuk M. *Onkourologie.* Praha: Galén, Karolinum 2005, 589s., ISBN 80-7262-349-4 (Galén), 80-246-1108-2 (Karolinum)

21. Beltran AL, Cheng L, Montironi R, et al. Clinicopathological characteristics and outcome of nested carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch*, 2014. 465: 199.
22. Sobin LH, Gospodarowicz M., Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. 2009, Wiley-Blackwell.
23. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading and diagnosis. *Urology* 2005; 66:4-34.
24. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, et al. Superficial bladder cancer. Progression and recurrence. *J Urol*. 1983; 130:1083-1086.
25. van Rhijn BWG, Burger M, Lotan Y, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol* 2009; 56:430-42.
26. 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.
27. 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.
28. Sauter G, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: WHO classification of classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Eds. 2004, IARCC Press: Lyon.
29. Babjuk M, Böhle A, Burger M, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*. 2017 Mar;71(3):447-461.
30. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4th ed. ed, ed. O. H. 2016, Lyon, France
31. Soukup V, Capoun O, Cohen D, et al. Prognostic Performance and Reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading Classification Systems in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A European Association of Urology Non-

muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol*, 2017. 72: 801.

32. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol*, 2007. 51: 889.

33. Otto W, Breyer J, Herdegen S, et al. WHO 1973 grade 3 and infiltrative growth pattern proved, aberrant E-cadherin expression tends to be of predictive value for progression in a series of stage T1 high-grade bladder cancer after organ-sparing approach. *Int Urol Nephrol*, 2017. 49: 431.

34. Colombo R, Hurleb R, Moschini M, et al. Feasibility and Clinical Roles of Different Substaging Systems at First and Second Transurethral Resection in Patients with T1 High-Grade Bladder Cancer. *Eur Urol Focus*. 2018 Jan;4(1):87-93.

35. Mari A, Kimura S, Foerster B, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of the impact of Lymphovascular Invasion in Bladder Cancer Transurethral Resection Specimens. *BJU Int*. 2018 May 28. doi: 10.1111/bju.14417. [Epub ahead of print]

36. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 2006. 49: 466.

37. Rieken M, Shariat SF, Kluth L, et al. Comparison of the EORTC tables and the EAU categories for risk stratification of patients with nonmuscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol*. 2018 Jan;36(1):8.e17-8.e24.

38. Brausi M, Collette L, Kurth K, et al. Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy after TUR in stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined analysis of seven EORTC studies. *Eur Urol*, 2002. 41: 523.

39. Mariappan P, Finney SM, Head E, et al. Good quality white-light transurethral resection of bladder tumours (GQ-WLTURBT) with experienced surgeons performing complete resections and obtaining detrusor muscle reduces early recurrence in new non-muscle-invasive bladder cancer: validation across time and place and recommendation for benchmarking. *BJU Int*, 2012. 109: 1666.

40. Mariappan P, ariappan P1, Zachou A, Grigor KM; Edinburgh Uro-Oncology Group. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *Eur Urol*. 2010 May;57(5):843-9.
41. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, et al. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol*, 2016. 69: 231.
42. Huncharek M, McGarry R, Kupelnick B. Impact of intravesical chemotherapy on recurrence rate of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder: results of a meta-analysis. *Anticancer Res*, 2001. 21: 765.
43. Bosschieter J, Nieuwenhuijzen JA, van Ginkel T et al. Value of an Immediate Intravesical Instillation of Mitomycin C in Patients with Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Prospective Multicentre Randomised Study in 2243 patients. *Eur Urol*. 2018 Feb;73(2):226-232.
44. Malmstrom PU, Sylvester RJ, Crawford DE, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, 2009. 56: 247.
45. Sylvester RJ, van der MEIJDEN AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 2002. 168: 1964.
46. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Witjes JA, Kurth K. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 2005. 174: 86.
47. Witjes J, et al., EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. EAU Guidelines 2018, Edn. presented at the 33rd EAU Annual Congress. European Association of Urology, Arnhem, The Netherlands.

48. Shariat SF, Karakiewicz PI, Palapattu GS, et al. Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium. *J Urol*, 2006. 176: 2414.
49. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data. Advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol*, 2005. 48: 202.
50. Stein JP. Contemporary concepts of radical cystectomy and the treatment of bladder cancer. *J Urol*, 2003. 169: 116.
51. Rosenblatt R, Sherif A, Rintala E, et al. Pathologic downstaging is a surrogate marker for efficacy and increased survival following neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy for muscle-invasive urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, 2012. 61: 1229.
52. 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.
53. Soto Parra H, Cavina R, Latteri F, 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.
54. Bellmunt J, Petrylak DP. New therapeutic challenges in advanced bladder cancer. *Semin Oncol*, 2012. 39: 598.
55. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, 2017. 389: 67.
56. O'Donnell PH, Plimack ER, Bellmunt J, et al. Pembrolizumab (Pembro; MK-3475) for advanced urothelial cancer: Results of a phase IB study. *J Clin Oncol* 2015. 33: 296.
57. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, 2016. 387: 1909.
58. Powles T, Durán I, van der Heijden MS, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma

(IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2018 Feb 24;391(10122):748-757.

59. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 2017 Mar 16;376(11):1015-1026.

60. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2017. 18: 312.

61. Bensalah K, Montorsi F, Shariat SF: Challenges of cancer biomarker profiling. *Eur Urol* 2007; 52: 1601–1609.

62. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*. 2009 Jun; 22 Suppl 2:S53-9.

63. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W. Identification of clinically useful cancer prognostic factors: what are we missing? *J. Natl Cancer Inst*. 2005; 97:1023–1025.

64. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med*. 2008; 359:1757–1765.

65. Lotan Y, Elias K, Svatek RS, et al. Bladder cancer screening in a high risk asymptomatic population using a point of care urine based protein tumor marker. *J Urol* 2009; 182:52–7.

66. Schmitz-Drager BJ, Tirsar LA, Schmitz-Drager C, et al. Immunocytology in the assessment of patients with asymptomatic hematuria. *World J Urol* 2008; 26:31–37.

67. Messing EM, Madeb R, Young T, et al. Long-term outcome of hematuria home screening for bladder cancer in men. *Cancer*. 2006; 107:2173–9.

68. Zlotta AR, Roumeguere T, Kuk C, et al. Select Screening in a Specific High-Risk Population of Patients Suggest a Stage Migration Towards Detection of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Eur Urol* 2011; 59:1026-1031

69. Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, et al: Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with



focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:295–301.

70. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2015 Feb;33(2):66.e25-31

71. Yafi FA, Brimo F, Auger M, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Is the performance of urinary cytology as high as reported historically? A contemporary analysis in the detection and surveillance of bladder cancer. *Urol Oncol*. 2013, 32, e1–6.

72. van der Aa MN, Steyerberg EW, Bangma C, van Rhijn BWG, Zwarthoff EC, van der Kwast TH. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial. *J Urol*, 2010. 183: 76.

73. Odisho AY, Berry AB, Ahmad AE, Cooperberg MR, Carroll PR, Konety BR. Reflex immunoCyt testing for the diagnosis of bladder cancer in patients with atypical urine cytology. *Eur Urol* 2013;63:936–40.

74. Comploj E, Mian C, Ambrosini-Spaltro A, et al. uCyt+/ImmunoCyt and cytology in the detection of urothelial carcinoma: an update on 7422 analyses. *Cancer Cytopathol*. 2013 Jul;121(7):392-7.

75. Tętu B, Tiguert R, Harel F, Fradet Y. ImmunoCyt/uCyt+ improves the sensitivity of urine cytology in patients followed for urothelial carcinoma. *Mod. Pathol*. 2005; 18:83-89.

76. Bensalah K, Montorsi F, Shariat SF. Challenges of cancer biomarker profiling. *Eur Urol*. 2007 Dec;52(6):1601-9

77. Wakui M, Shiigai T. Urinary tract cancer screening through analysis of urinary red blood cell volume distribution. *Int. J. Urol*. 2000; 7:248–253.

78. Messing EM, Young TB, Hunt VB, Wehbie, JM, Rust P. Urinary tract cancers found by homescreening with hematuria dipsticks in healthy men over 50 years of age. *Cancer* 1989; 64:2361–2367.

79. Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Home screening for hematuria: Results of a multiclinic study. *J. Urol.* 1992; 148:289–292.
80. Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology* 1995; 45:387–396.
81. Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Hematuria home screening: repeat testing results. *J. Urol* 1995; 154:57–61.
82. Carmack AJ, Soloway MS. The diagnosis and staging of bladder cancer: from RBCs to TURs. *Urology* 2006; 67:3–8.
83. Rübber H, Bubbenzer J, Bökenkamp K, Lutzeyer W, Rathert P. Grading of transitional cell tumours of the urinary tract by urinary cytology. *Urol Res.* 1979 Jun 22; 7(2):83-91.
84. Shariat SF, Canto EI, Kattan MW, et al: Beyond prostate-specific antigen: new serologic biomarkers for improved diagnosis and management of prostate cancer. *Rev Urol* 2004; 6: 58–72.
85. Steiner H, Bergmeister M, Verdorfer I, et al. Early results of bladder-cancer screening in a high-risk population of heavy smokers. *BJU Int* 2008; 102: 291–296.
86. van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 2005; 47: 736–748.
87. Schmitz-Dräger BJ, Tirsar LA, Schmitz-Dräger C, et al: Immunocytology in the assessment of patients with asymptomatic hematuria. *World J Urol* 2008; 26: 31–37.
88. Wiener HG, Vooijs GP, van't Hof-Grootenboer B. Accuracy of urinary cytology in the diagnosis of primary and recurrent bladder cancer. *Acta Cytol.* 1993; 37:163–169.
89. VandenBussche CJ, Rosenthal DL, Olson MT. Adequacy in voided urine cytology specimens: The role of volume and a repeat void upon predictive values for high-grade urothelial carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2016 Mar;124(3):174-80.
90. Owens CL, Vandenbussche CJ, Burroughs FH, Rosenthal DL. A review of reporting systems and terminology for urine cytology. *Cancer Cytopathol.* 2013 Jan;121(1):9-14.

91. Piaton E, Decaussin-Petrucci M, Mege-Lechevallier F, et al. Diagnostic terminology for urinary cytology reports including the new subcategories ‘atypical urothelial cells of undetermined significance’ (AUC-US) and ‘cannot exclude high grade’ (AUC-H). *Cytopathology* 2014;25:27–38.
92. Barkan GA, Wojcik EM, Nayar R, et al. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Acta Cytol.* 2016;60(3):185-97.
93. Rosenthal DL, Wojcik E, Kurtycz DF. *The Paris System for Reporting Urinary Cytology.* (1st ed): New York: Springer; 2015.
94. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al: Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005;66(6 suppl 1): 35–63.65.
95. Sánchez-Carbayo M, Herrero E, Megías J, et al: Initial evaluation of the new urinary bladder cancer rapid test in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 1999; 54: 656–661.
96. Babjuk M, Kostírová M, Mudra K, et al: Qualitative and quantitative detection of urinary human complement factor H-related protein (BTA stat and BTA TRAK) and fragments of cytokeratins 8, 18 (UBC rapid and UBC IRMA) as markers for transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2002; 41: 34–39.
97. Schroeder GL, Lorenzo-Gomez MF, Hautmann SH, et al: A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. *J Urol* 2004; 172: 1123–1126.
98. Pichler R, Tulchiner G, Fritz J, Schaefer G, Horninger W, Heidegger I. Urinary UBC Rapid and NMP22 Test for Bladder Cancer Surveillance in Comparison to Urinary Cytology: Results from a Prospective Single-Center Study. *Int J Med Sci.* 2017; 14(9): 811–819.
99. Kinders R, Jones T, Root R, et al. Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4:2511–2520.

100. Mian C, Lodde M, Haitel A, et al. Comparison of two qualitative assays, the UBC rapid test and the BTA stat test, in the diagnosis of urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2000; 56:228–231.
101. Lokeshwar VB, Soloway MS. Current bladder tumor tests: does their projected utility fulfill clinical necessity? *J Urol* 2001; 165:1067–1077.
102. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005; 66:35–63.
103. Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can. Urol. Assoc. J.* 2008; 2:212–221.
104. Grossman HB, Soloway M, Messing E, et al. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2006; 295:299–305.
105. Shariat SF, Marberger MJ, Lotan Y, et al. Variability in the performance of nuclear matrix protein 22 for the detection of bladder cancer. *J Urol* 2006; 176:919–926.
106. Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, et al: Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, Immuno-Cyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technol Assess* 2010; 14: 1–331, iii–iv.
107. Van Le TS, Miller R, Barder T, et al: Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology* 2005; 66: 1256–1260.
108. van Rhijn BW, Lurkin I, Kirkels WJ, et al. Microsatellite analysis—DNA test in urine competes with cystoscopy in follow-up of superficial bladder carcinoma: a phase II trial. *Cancer* 2001; 92:768–775.
109. Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, et al. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* 1999; 161:388–394.
110. Bergeron A, LaRue H, Fradet Y. Identification of a superficial bladder tumor-associated glycoform of the carcinoembryonic antigen by monoclonal antibody 19A211. *Cancer Res.* 1996; 56:908–915.

111. Fradet Y, Lockhart C, The Immunocyt Trialists. Performance characteristics of a new monoclonal antibody test for bladder cancer: Immunocyt<sup>TM</sup>. *Can J Urol* 1997; 4:400–405.
112. Messing EM, Teot L, Korman H, et al: Performance of urine test in patients monitored for recurrence of bladder cancer: a multicenter study in the United States. *J Urol* 2005; 174: 1238–1241.
113. Piaton E, Daniel L, Verrielle V, et al. Improved detection of urothelial carcinomas with fluorescence immunocytochemistry (uCyt<sup>+</sup> assay) and urinary cytology: results of a French Prospective Multicenter Study. *Lab Invest* 2003; 83:845–852.
114. Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, et al. Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 127:295–301.
115. Schlomer BJ, Ho R, Sagalowsky A, et al: Prospective validation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder. *J Urol* 2010; 183: 62–67.
116. Williams GH, Stoeber K. Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007; 19:672–679.
117. Machida YJ, Hamlin JL, Dutta A. Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 2005; 123:13–24.
118. Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J. Cell Sci.* 2001; 114:2027–2041.
119. Stoeber K, Halsall I, Freeman A, et al. Immunoassay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine. *Lancet* 1999; 354:1524–1525.
120. Stoeber K, Swinn R, Prevost AT, et al. Diagnosis of genitourinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments. *J. Natl Cancer Inst.* 2002; 94:1071–1079.

121. Loddo M, Kingsbury SR, Rashid M, et al. Cell-cycle-phase progression analysis identifies unique phenotypes of major prognostic and predictive significance in breast cancer. *Br. J. Cancer* 2009; 100:959–970.
122. Michiels S, Koscielny S, Hill C. Interpretation of microarray data in cancer. *Br. J. Cancer* 2007; 96:1155–1158.
123. Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, Buick RN. A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays. *J. Natl Cancer Inst.* 1983; 70:9–16.
124. Schiffer E, Mischak H, Theodorescu D, Vlahou A. Challenges of using mass spectrometry as a bladder cancer biomarker discovery platform. *World J Urol* 2008; 26(1):67–74.
125. Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, et al. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci* 2005; 96:317–22.
126. Kim YK, Kim WJ. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer. *Int J Urol* 2009; 16(1):17–22.
127. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1148–59.
128. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349:2042–54.
129. Yu J, Zhu T, Wang Z, et al. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2007 Dec 15; 13(24):7296–304.
130. Vrooman OP, Witjes JA. Molecular markers for detection, surveillance and prognostication of bladder cancer. *Int J Urol* 2009; 16(3):234–43.
131. Lodde M, Fradet Y. The detection of genetic markers of bladder cancer in urine and serum. *Curr Opin Urol* 2008; 18(5):499–503.
132. Rosser CJ, Liu L, Sun Y, et al. Bladder cancer-associated gene expression signatures identified by profiling of exfoliated urothelia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:444–453.

133. Hanke M, Kausch I, Dahmen G, et al. Detailed technical analysis of urine RNA based tumor diagnostics reveals ETS2/urokinase plasminogen activator to be a novel marker for bladder cancer. *Clin Chem* 2007; 53:2070–2077.
134. Mandel P, Metais P. Les acides du plasma sanguin chez l’homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142: 241–243
135. Antonatos D, Patsilidakos S, Spanodimos S, Korkonikitas P, Tsigas D. Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 278–281.
136. García Moreira V, Prieto García B, Baltar Martín JM, Ortega Suárez F, Alvarez FV. Cell-free DNA as a noninvasive acute rejection marker in renal transplantation. *Clin Chem* 2009; 55: 1958–1966.
137. Biró O, Rigó J Jr, Nagy B. Noninvasive prenatal testing for congenital heart disease - cell-free nucleic acid and protein biomarkers in maternal blood. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018 Aug 5:1-11.
138. Hauser S, Zahalka T, Fechner G, Müller SC, Ellinger J. Serum DNA hypermethylation in patients with kidney cancer: results of a prospective study. *Anticancer Res* 2013; 33: 4651–4656.
139. Ellinger J, El Kassem N, Heukamp LC, et al. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *J Urol* 2008; 179: 346–352.
140. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from Clinical applications of ucfDNA in cancer cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000; 46: 1078-1084.
141. Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 239-249.
142. Hauser S, Kogej M, Fechner G, et al. Cell-free serum DNA in patients with bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *Anticancer Res* 2012; 32: 3119–3124.
143. Wang BG, Huang HY, Chen YC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res* 2003; 63: 3966–3968.

144. Casadio V, Calistri D, Tebaldi M, et al. Urine cell-free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: preliminary data. *Urol Oncol* 2013; 31: 1744–1750.
145. Hauser S, Kogej M, Fechner G, et al. Cell-free serum DNA in patients with bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *Anticancer Res* 2012; 32: 3119–3124.
146. Zancan M, Galdi F, Di Tonno F, et al. Evaluation of cell-free DNA in urine as a marker for bladder cancer diagnosis. *Int J Biol Markers* 2009; 24: 147–155.
147. Chang HW, Tsui KH, Shen LC, Huang HW, Wang SN, Chang PL. Urinary cell-free DNA as a potential tumor marker for bladder cancer. *Int J Biol Markers* 2007; 22: 287–294.
148. Su YH, Wang M, Brenner DE, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotidesized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2004; 6: 101-107.
149. Ralla B, Stephan C, Meller S, Dietrich D, Kristiansen G, Jung K. Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; 51: 200-231.
150. Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol*. 2009; 28(6):655-61.
151. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006 Nov;6(11):857-66.
152. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
153. Hromadnikova I, Kotlabova K, Doucha J, Dlouha K, Krofta L. Absolute and relative quantification of placenta-specific micrnas in maternal circulation with placental insufficiency-related complications. *J Mol Diagn*. 2012 Mar-Apr;14(2):160-7.
154. Catto JW, Miah S, Owen HC, et al. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8472-81.



155. Lin T, Dong W, Huang J, et al. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. *J Urol*. 2009 Mar;181(3):1372-80.
156. Zhang DZ, Lau KM, Chan ES, et al. Cell-free urinary microRNA-99a and microRNA-125b are diagnostic markers for the non-invasive screening of bladder cancer. *PLoS One*. 2014 Jul 11;9(7):e100793.
157. Yun SJ, Jeong P, Kim WT, et al. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. *Int J Oncol*. 2012 Nov;41(5):1871-8.
158. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct;18(10):997-1006.
159. Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 4;390(1):1-4.
160. Zhou H, Tang K, Xiao H, et al. A panel of eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 May 21;34:53.
161. Pignot G, Cizeron-Clairac G, Vacher S, et al. microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *Int J Cancer*. 2013 Jun 1;132(11):2479-91.
162. Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, et al. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br J Cancer*. 2011 Mar 1;104(5):808-18.
163. Mahdavinezhad A, Mousavibahar SH, Poorolajal J, et al. Association between tissue miR-141, miR-200c and miR-30b and bladder cancer: a matched case-control study. *Urol J*. 2015 Feb 22;12(1):2010-3.
164. Mahdavinezhad A, Mousavi-Bahar SH, Poorolajal J, et al. Evaluation of miR-141, miR-200c, miR-30b Expression and Clinicopathological Features of Bladder Cancer. *Int J Mol Cell Med*. 2015 Winter;4(1):32-9.

165. Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Kenney PA, et al. A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype. *Urol Oncol*. 2011 Nov-Dec;29(6):794-801.e1.
166. Feng Y, Kang Y, He Y, et al. microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer. *BMC Urol*. 2014 Jun 23;14:50.
167. Wei S, Bing Z, Yao Y, Master SR, Gupta P. Higher Expression of miR-182 in Cytology Specimens of High-Grade Urothelial Cell Carcinoma: A Potential Diagnostic Marker. *Acta Cytol*. 2015;59(1):109-12.
168. Snowdon J, Boag S, Feilotter H, Izard J, Siemens DR. A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *Can Urol Assoc J*. 2013 Jan-Feb;7(1-2):28-32.
169. Zhou X, Zhang X, Yang Y, et al. Urinary cell-free microRNA-106b as a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Med Oncol*. 2014 Oct;31(10):197.
170. Kim SM, Kang HW, Kim WT, et al. Cell-Free microRNA-214 From Urine as a Biomarker for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Korean J Urol*. 2013 Nov;54(11):791-6.
171. Cannas A, Kalunga G, Green C, et al. Implications of storing urinary DNA from different populations for molecular analyses. *PLoS One*. 2009 Sep 10;4(9):e6985.
172. Utting M, Werner W, Dahse R, Schubert J, Junker K. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 35-40.
173. Kim YH, Yan C, Lee IS, et al. Value of urinary topoisomerase-IIA cell-free DNA for diagnosis of bladder cancer. *Investig Clin Urol* 2016; 57:106-112.
174. Zancan M, Franceschini R, Mimmo C, et al. Free DNA in urine: a new marker for bladder cancer? Preliminary data. *Int J Biol Markers*. 2005 Apr-Jun;20(2):134-6.
175. Dweep H, Gretz N, Sticht C. In: (Eds.), *RNA Mapping*, Springer, 2014, 289–305.

176. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.  
Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA.
177. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):1-13.
178. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):855-62.
179. Lamba V, Ghodke-Puranik Y, Guan W, Lamba JK. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Res Notes.* 2014 Mar 7;7:129.
180. Weber JA, Baxter DH, Zhang S. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010 Nov;56(11):1733-41.
181. Jarry J, Schadendorf D, Greenwood C, Spatz A, van Kempen LC. The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions. *Mol Oncol.* 2014 Jun;8(4):819-29.

## 6. Souhrn

Nádor močového měchýře (NMM) představuje nejčastější malignitu močového traktu. Jeho incidence vykazuje v posledních letech v ČR stabilní úroveň, celosvětově však narůstá. Zásadní je poměr incidence a mortality, který je u NMM ze všech nádorů močopohlavního traktu nejvyšší. Časná diagnostika a správná léčba je tedy pro prognózu určující. Existuje několik komerčně dostupných neinvazivních testů z moči, žádný z nich však zatím není doporučen jako standard v jakékoli indikaci. Cytologie moči tak se všemi svými limitacemi zůstává jediným široce používaným testem jako doplněk invazivní cystoskopie. Volné nukleové kyseliny v moči, respektive supernatantu moči, patří mezi potenciální nádorové biomarkery. Volná DNA (ucfDNA) je do moči vylučována z buněk podléhajících nekróze a apoptóze, nicméně mohou pocházet i z normálních živých buněk. Jejich hladina v moči nebo séru tedy může značit přítomnost nádorového onemocnění. Micro RNA (miRNA) jsou krátké nekódující sekvence RNA, které jsou produkovány mimo jádro a vážou se ke komplementárním sekvencím na mRNA, čímž ovlivňují její translaci a tvorbu proteinů. Hrají tedy důležitou roli při dělení buněk a tedy i kancerogenzi. V naší práci jsme pomocí metod molekulární biologie porovnávali hladiny ucfDNA v supernatantu moči kontrol a pacientů s NMM různých patologických stádií a stupňů buněčné diferenciace. Důležitým aspektem bylo vytvoření standardizované metodologie stanovení kvantity ucfDNA. Stejný přístup byl aplikován i při stanovení exprese miRNA. Zjistili jsme signifikantně vyšší kvantity ucfDNA u pacientů s vyššími stádii NMM a high grade nádory. Exprese 5 miRNA byla významně down-regulována u pacientů s nádory. Naše výsledky vnesly do problematiky nové poznatky, na kterých lze stavět při navrhování dalších studií.

**Klíčová slova:** karcinom močového měchýře; neinvazivní biomarker; volná DNA; micro RNA.

## **Summary**

Bladder cancer represents the most common malignancy of the uropoetic tract. Its incidence has been stable in the last couple of years in the Czech Republic, worldwide rises though. A ratio of incidence and mortality is considerable in bladder cancer since it is highest out of all genitourinary malignancies. An early diagnosis and adequate treatment is therefore determining for its prognosis. There are several commercially available urine tests, none of them is recommended as a standard diagnostic tool in any indication though. Urine cytology, as a complement of invasive cystoscopy, remains the only widely used method with all its limitations. Cell-free nucleic acids in urine (urine supernatant) belong among potential tumour biomarkers. Cell-free urinary DNA (ucfDNA) is excreted by cells undergoing necrosis or apoptosis although it can also originate from living cells. Their level in urine or serum can thus indicate a presence of malignancy. Micro RNA (miRNA) are short non-coding sequences of RNA produced outside of nucleus. They bind to complementary sequences of mRNA thus affecting its translation and protein formation. As such they play an important role in cell division and cancerogenesis. In our study, we correlated levels of ucfDNA in controls and patients with urothelial carcinoma of different stages and cell differentiation using methods of molecular biology. Development of standardized methodology to determine the quantity of ucfDNA represented very important aspect of the study. The same approach was used by determination of miRNA expression. We found significantly higher levels of ucfDNA in patients with more advanced tumours and high grade tumours. Expression of 5 miRNAs was significantly down-regulated in patients with cancer. Our results have

brought some new insight into the issue upon which to build while designing new studies.

**Key words:** urinary bladder urothelial carcinoma; non-invasive biomarker; cell-free DNA; micro RNA.

## **7. Publikace výsledků se vztahem k tématu dizertace**

1. Brisuda A, Pazourkova E, Soukup V, Horinek A, Hrbacek J, Capoun O, Svobodova I, Pospisilova S, Korabecna M, Mares J, Hanus T, Babjuk M. Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer. *Urol Int.* 2016;96(1):25-31. IF 1,611
2. Pospisilova S, Pazourkova E, Horinek A, Brisuda A, Svobodova I, Soukup V, Hrbacek J, Capoun O, Hanus T, Mares J, Korabecna M, Babjuk M. MicroRNAs in urine supernatant as potential non-invasive markers for bladder cancer detection. *Neoplasma.* 2016;63(5):799-808. IF 1,871
3. Pazourkova E, Pospisilova S, Svobodova I, Horinek A, Brisuda A, Soukup V, Hrbacek J, Capoun O, Mares J, Hanus T, Babjuk M, Korabecna M. Comparison of MicroRNA Content in Plasma and Urine Indicates the Existence of a Transrenal Passage of Selected MicroRNAs. *Adv Exp Med Biol.* 2016;924:97-100. IF 1,881

## **8. Dedikace grantu**

Práce vznikla s podporou grantu IGA MZ CR, NT12417 (FNM G5260).

## **9. Poděkování**

Na závěr bych chtěl poděkovat zejména svému školiteli Prof. MUDr. Marku Babjukovi, CSc. za ukázání cesty nejen v souvislosti s touto dizertační prací, ale i v profesním životě obecně, a za umožnění kráčet po této cestě. Mé uznání a vděk patří také všem spoluautorům, kteří se podíleli na realizaci a publikaci celého projektu. Děkuji přátelům za cennou pomoc a rady při psaní práce. Bez podpory a trpělivosti mojí manželky bych se při vzniku této práce také neobešel. Všem velmi děkuji.