

**UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Změny v metylaci DNA jako potenciální biomarkery

v léčbě karcinomu močového měchýře

Petr Hušek

**Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Chirurgie**

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Chirurgie na Katedře chirurgie, Lékařské fakulty v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Autor: MUDr. Petr Hušek
Urologická klinika FN HK a LF HK

Školitel: doc. MUDr. Jaroslav Pacovský, Ph. D.
Urologická klinika FN HK a LF HK

Školitel konzultant: Mgr. Marcela Chmelařová, Ph. D.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky FN HK a LF HK

Oponenti: prof. MUDr. Vladimír Študent, Ph.D.
Urologická klinika LF UP a FN v Olomouci

doc. MUDr. Jan Doležel, Ph.D.
Masarykův onkologický ústav v Brně

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Katedry chirurgie dne 17.9.2020 v budově Chirurgické kliniky, Bedrnův pavilon, areál FNHK od 9:00 hod.

Tato práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MH CZ – DRO (UHHK, 00179906)

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. RNDr. Milan Kaška, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Chirurgie
Garant studijního programu

Obsah

1. Souhrn	3
2. Summary	5
3. Úvod do problematiky	6
4. Cíle dizertační práce	7
5. Výzkumná část	
5.1. Retrospektivní zhodnocení výsledků léčby u pacientů s <i>high grade</i> NMIBC a CIS močového měchýře, kteří absolvovali BCG instalační terapii.....	7
5.1.1. <i>Cíl</i>	7
5.1.2. <i>Soubor a metoda</i>	7
5.1.3. <i>Výsledky</i>	8
5.1.4. <i>Závěr</i>	8
5.2. Studium epigenetických změn ve tkáni <i>high grade</i> NMIBC a CIS.....	9
5.2.1. <i>Cíl</i>	9
5.2.2. <i>Soubor a metoda</i>	9
5.2.3. <i>Výsledky</i>	12
5.2.4. <i>Závěr</i>	12
5.3. Hledání epigenetického markeru predikujícího léčebnou odpověď BCG vakcíny v léčbě <i>high grade</i> NMIBC a CIS.....	13
5.3.1. <i>Cíl</i>	13
5.3.2. <i>Soubor a metoda</i>	13
5.3.3. <i>Výsledky</i>	13
5.3.4. <i>Závěr</i>	13
6. Použitá literatura	13
7. Přehled publikační činnosti autora.....	23

1. Souhr

Úvod

Karcinom močového měchýře je druhou nejčastější malignitou postihující močové cesty. Karcinom močového měchýře lze rozdělit na dvě základní kategorie. Až 75 % pacientů je postiženo neinvazivní formou (non muscle invasive bladder cancer – NMIBC) postihující pouze sliznici a podslizniční tkáň. Carcinoma in situ (CIS) je velmi specifickou podskupinou NMIBC, jedná se o nepapilární plochou nádorovou lézi, která je snadno přehlednutelná při cystoskopickém vyšetření. CIS je vždy high grade tumor. Až u 54 % pacientů s CIS, pokud nejsou adekvátně léčeni, přechází nádor do invazivní nebo metastatické formy. Druhou skupinou jsou pacienti s invazivním karcinomem močového měchýře (muscle invasive bladder cancer – MIBC). U této skupiny pacientů je výrazně horší prognóza spojená s vyšší nádorově specifickou mortalitou v porovnání s první skupinou. Pacienti s NMIBC jsou indikováni k transuretrální resekci tumoru (TUR), a to samostatně nebo v návaznosti na adjuvatní léčbu. Ta spočívá v intravezikální chemoterapii či Bacillus Calmette-Guérin (BCG) intravezikální imunoterapii. BCG je oslabené mykobakterium původně vyvinuté jako vakcinace proti tuberkulóze. Při intravezikální aplikaci této vakcíny byl prokázán protinádorový efekt se signifikantním snížením pravděpodobnosti progresu onemocnění u pacientů s NMIBC high grade tumory a CIS. Základem léčby MIBC je radikální cystektomie, tedy rozsáhlý chirurgický výkon, výrazně mutilující pacienty s výrazným dopadem na kvalitu

jejich života. Nutnou součástí výkonu je zajištění derivace moče. Naše výzkumná aktivita je dominantně zaměřena na pacienty s NMIBC high grade tumory a CIS. U této hraniční skupiny pacientů mezi NMIBC a MIBC je možno volit konzervativní či radikální léčebný přístup. Konzervativní léčba spočívá v kompletní endoresekcii tumoru a adjuvatní intravezikální BCG imunoterapii. Radikální léčba tkví v radikální cystektomii. V současnosti neexistuje biochemický marker, který by pomohl rozhodnout mezi těmito léčebnými možnostmi. Na jedné straně je obava ze selhání konzervativní terapie, na druhé straně pak neadekvátní mutilace pacienta spojená s radikální cystektomií. Etiologie vzniku karcinomu močového měchýře je multifaktoriální, spočívá v kombinaci vlivů zevního prostředí, genetických a epigenetických faktorů. Náš výzkum je zaměřen na změny metylací v nádorové tkáni karcinomu močového měchýře, jako nejvíce známou epigenetickou alterací. Hypermetylace nemetylovaných cytosine-phosphate-guanine (CpG) ostrůvků promotorových oblastí tumor supresorových genů je jedním z nově popsáných mechanismů karcinogeneze.

Cíl

Genetické a epigenetické změny hrají důležitou roli v procesu patogeneze uroteliálního karcinomu. Hlubší porozumění těchto procesů může zlepšit diagnostiku a léčbu této zákeřné choroby. Cílem toho výzkumu je popsání metylačních změn v nádorové tkáni typických pro karcinom močového měchýře pomocí metylační analýzy vybraných tumor supresorových genů. Následně pak tyto znalosti využít v odhadu úspěšnosti BCG instilační terapie u pacientů s NMIBC high grade tumorem a CIS. Pro tento účel byl využit soubor pacientů, kteří v minulosti absolvovali BCG instilační terapii na našem pracovišti.

Metoda

Retrospektivně jsme zhodnotili data 82 pacientů s NMIBC high tumor a CIS, kteří absolvovali instilační BCG terapii. U pacientů, kteří splnili vstupní kritéria byla provedena metylační analýza nádové tkáně uložené v archívu patologického ústavu. Pro samotnou analýzu metylačních změn vybraných tumor supresorových genů byla použita metoda MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, sety ME001 a ME004). Kontrolní skupinou byly tkáně zdravého urotelu 13 pacientů. Odhalené metylační změny byly následně využity k porovnání skupin pacientů dle úspěchu či selhání BCG léčby.

Výsledky

U high grade NMIBC a CIS jsme nově identifikovali metylace genů MUS81a, NTRK1 a PCCA. Změny metylací genů CDKN2B ($p=0,00312^{**}$) a MUS81a ($p=0,0191^{*}$) jsou spojeny s klinickou odpovědí na podávání BCG vakcíny. Nepřítomnost metylací genů CDKN2B a MUS81a je spojena se selháním BCG léčby.

Závěr

Výsledky našeho výzkumu potvrzují významnost epigenetických změn v procesu karcinogeneze uroteliálního karcinomu. Změny metylací vybraných tumor supresorových genů (TSGs) mají potenciál v předurčení léčebné odpovědi BCG vakcíny v léčbě high grade NMIBC a CIS. Tumor supresorové geny jako CDKN2b, MUS81a se zdají velmi slibné pro další výzkum.

2. Summary

DNA methylation changes as potential biomarkers in the treatment of bladder cancer

Introduction

Bladder Cancer (BC) is the second most common malignancy of the urinary tract. BC has two categories. Approximately 75 % of patients with BC present with disease confined to the mucosa or submucosa (non muscle invasive bladder tumor – NMIBC). Carcinoma in situ (CIS) is a very specific subgroup of NMIBC, because it is not a papillary lesion but a flat tumor, which is why CIS can be missed in cystoscopy. CIS is always a high grade tumor. Without any treatment, approximately 54% of patients with CIS progressed to muscle-invasive or metastatic disease. The second category covers patients with muscle-invasive BC (MIBC). These patients have a higher prevalence of progression rates and higher cancer-specific mortality. Patients with NMIBC are indicated to transurethral tumor resection (TUR) alone or with adjuvant treatment (intravesical chemotherapy or intravesical Bacillus Calmette-Guérin - BCG immunotherapy). BCG is an attenuated mycobacterium developed as a vaccine for tuberculosis that has demonstrated antitumor activity in BC intravesical instillation, and significantly reduces the progression risk of high grade papillary lesion and CIS. The therapy of MIBC is radical cystectomy – hard mutilating surgery with urinary diversion. This procedure has significant impact on the quality of the patient's life. Patients with NMIBC high grade tumor and CIS are the focus of our interest. It is a borderline subgroup, where radical and non-radical treatments are both possible. Non-radical therapy means complete tumor resection with adjuvant intravesical immunotherapy (BCG vaccine). Radical therapy means radical cystectomy. At present we have no markers which would be helpful in deciding optimal therapy. Weighing the risk of failure of non-radical treatment against overtreatment by radical therapy constantly presents a dilemma. The etiology of BC is multifactorial, driven by the multistep accumulation of environmental, genetic and epigenetic factors. Our research was focused on differences methylation status in bladder cancer tissue like the most known epigenetic alteration. A new model for the mechanism of carcinogenesis has been proposed in which hypermethylation of unmethylated cytosine-phosphate-guanine (CpG) islands in the promoter regions of tumour suppressor genes (TSG) in normal cells silence these genes and this leads to the cells becoming cancerous.

Aims

Genetic and epigenetic alterations play an important role in urothelial cancer pathogenesis. Deeper understanding of these processes could help us achieve better diagnosis and management of this life-threatening disease. The aim of this research was to evaluate the typical methylation status differences of selected tumor suppressor genes in malign tissues. Then these methylation status differences are used for predicting BCG response in patients with high NMIBC and CIS. Patients who underwent BCG instillation in our department were included in this research.

Methods

We evaluated retrospectively data 82 patients with high grade NMIBC and CIS who had undergone BCG instillation therapy. Patients who have met inclusion criteria; methylation status of their urothelial malign tissues were analyzed. Tumor tissues were stored in pathological department. We used the MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification probe sets ME001 and ME004). The control group covered

13 specimens of normal urotel (bladder tissue). Then we compared epigenetic methylation status in BCG-responsive and BCG-failure groups.

Results

Newly identified methylations in high grade NMIBC were found in MUS81a, NTRK1 and PCCA. The methylation status of CDKN2B ($p=0.00312^{**}$) and MUS81a ($p=0.0191^{*}$) is associated with clinical outcomes of BCG instillation therapy response. CDKN2B and MUS81a unmethylation was found in BCG failure patients.

Conclusion

The results advocate the importance of epigenetic mechanism in carcinogenesis. The methylation status differences of selected tumor suppressor genes (TSGs) has the potential for predicting BCG response in patients with NMIBC high grade tumours. Tumour suppressor genes such as CDKN2b, MUS81a are very promising for future research.

3. Úvod do problematiky

Karcinom močového měchýře je druhou nejčastější malignitou postihující močové cesty. Z celkového počtu malignit u mužů zaujímá karcinom močového měchýře 7. Místo, u žen je na místě 17. Téměř třikrát častěji jsou toto malignitou postiženy muži. Medián výskytu se pohybuje kolem 70 let u obou pohlaví. V době diagnózy se karcinom močového měchýře vyskytuje v cca. 75% ve formě povrchového (neinvazivního) karcinomu. Tedy postihujícího sliznici či podslizniční tkáň, bez prorůstání do svaloviny měchýře. Jedná se o stádia Ta, T1 a karcinoma in situ (CIS). Velmi zákeřnou a obávanou formou je zejména CIS. Jedná se o high grade, plošné, plazivé postižení sliznice močového měchýře, která může být snadno přehlédnuta při běžném cystoskopickém vyšetření. CIS, pokud je neléčen, až v 54% pacientů přechází v invazivně rostoucí karcinom. Povrchový high grade karcinom močového a CIS jsou cílem naší výzkumné snahy. Léčba těchto forem karcinomu močového měchýře spočívá v kompletní endoresekcii tumoru v kombinaci s následnou Bacillus Calmette-Guérin (BCG) intravezikální instalační imunoterapií. Alternativou této léčby radikální cystektomie. Rozhodování v běžné klinické praxi mezi touto konzervativnější a radikální metodou je často velmi složité. Na jedné straně je obava ze selhání konzervativní terapie a ztráty času před radikálním řešením, která může mít zásadní dopad na onkologickou prognózu pacienta. Na straně druhé, obava z overtreatmentu, zbytečné mutilace pacienta a snížení kvality života, která je spojena s radikální cystektomií. Určitou formou pomoci je např. určování skóre rekurence či progresu onemocnění dle doporučení Evropské Urologické Společnosti. Nicméně jednoznačný klinický či biochemický marker, který by dokázal odlišit pacienty vhodné a nevhodné k BCG terapii, neexistuje. Cílem našeho výzkumu je pokusit se odlišit tyto dvě skupiny pacientů pomocí analýzy metylačních změn, ke kterým dochází v karcinogenezi uroteliálního karcinomu. Etiologii malignit, včetně karcinomu močového měchýře, bývá multifaktoriální. Na jejím vzniku se podílí vliv zevního prostředí, genetické a epigenetické procesy. Epigenetika je podobor genetiky zabývající nemorfologickými změnami DNA, která však hrají důležitou roli v karcinogenezi. Mezi epigenetické změny patří např. metylace DNA či acetylace histomů. Methylace DNA probíhá jako kovalentní chemická vazba metylové skupiny na C-5 (uhlík v pozici 5) cytosinového kruhu. Nejčastěji se metylace cytosinu vyskytuje v místě sekvence 5-CG-3 je zprostředkována DNA cytosin-metyltransferázou. Změny metylací v daných oblastech DNA vedou následně ke změně exprese tohoto genu. Z hlediska karcinogeneze jsou nejvýznamnější změny metylací v promotorových oblastech tumor supresorových genů

4. Cíle disertační práce

Přes široké a detailní znalosti patogeneze, diagnostiky a léčby karcinomu močového měchýře. Zůstává řada nejasných oblastí. Na některé z nich byl soustředěn zájem našeho výzkumu. Konkrétně se jednalo o *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře. V této oblasti jsme se zaměřili na vlastní výsledky léčby BCG vakcínou a možnostmi predikce odpovědi nádoru na tuto léčbu s využitím analýzy epigenetických změn v tkáni nádoru. Pro výzkumnou část práce jsme si stanovili tři základní cíle:

1. Retrospektivní zhodnocení výsledků léčby u pacientů s *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře, kteří absolvovali BCG instalační terapii.
2. Studium epigenetických změn ve tkáni *high grade* NMIBC a CIS.
3. Hledání epigenetického markeru predikujícího léčebnou odpověď BCG vakcíny v léčbě *high grade* NMIBC a CIS.

5. Výzkumná část

5.1. Retrospektivní zhodnocení výsledků léčby u pacientů s *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře, kteří absolvovali BCG instalační terapii

5.1.1. Cíl

BCG vakcína patří v současnosti k nejúčinnější nechirurgické metodě léčby vysoce maligního onemocnění urotelu. Na našem pracovišti má tato léčebná metoda dlouhodobou tradici a patří ke standardní léčbě indikovaných pacientů. Cílem této části bylo zhodnocení dlouhodobých výsledků léčby pacientů s využitím instalace BCG vakcínou.

5.1.2. Soubor a metoda

Retrospektivně jsme zhodnotili data 82 pacientů s povrchových *high grade* karcinomem močového měchýře (Ta, T1, CIS), kteří prodělali instalační BCG terapii po kompletní endoresekcii tumoru na Urologické klinice FN Hradec Králové. Základní soubor byl rozdělen do dvou podskupin a to na skupinu s dobrou odpovědí a skupinu se selháním léčby. Do skupiny pacientů s BCG selháním byli zařazeni pacienti, kde došlo buď k rekurenci či progresi onemocnění nebo dokonce zemřeli na chorobu během sledování. Do skupiny pacientů s dobrou odpovědí byli zařazeni ti, kde během sledování nedošlo k rekurenci *high grade* karcinomu či jeho progresi v invazivní nebo metastatický tumor. Doba sledování pacientů byla 2 až 13 roků. K zařazení do studie musely být splněny následující podmínky: kompletní, hluboká resekce tumoru s přítomností svaloviny detrusoru ve vzorku, žádná předchozí instalační terapie, kompletní 6 -týdenní indukční terapie BCG vakcínou následovanou udržovací BCG terapií. Schéma podávání udržovací BGG terapie není jednoznačně definováno žádnými doporučeními. Na Urologické klinice FNHK je dodržován protokol udržovací BCG terapie, spočívající v aplikaci BCG vakcíny v tříměsíčních cyklech.

V každém cyklu jsou podány 3 dávky v týdenních intervalech. Doba trvání udržovací terapie byla minimálně 12 měsíců, pokud nedošlo k selhání terapie dříve. Pacienti absolvují každé 3 měsíce kontrolní cystoskopii. Tyto definované podmínky splnilo 66 pacientů a ti byli zařazeni do studie. U sledovaného souboru jsme hodnotili demografická data: věk, pohlaví, životní styl (kouření). Dále jsme hodnotili charakteristiky nádoru: velikost tumoru (< 3 cm/≥ 3 cm), přítomnost či nepřítomnost CIS ve vzorku. U všech tumorů se vypočítalo EORT skóre rekurence a progresu. Dále byla zhodnocena celková léčebná odpověď na podanou BCG vakcínu. Pokud došlo k selhání léčby byla hodnocena doba do selhání a jeho závažnost (rekurence, progresu, smrt). Pro porovnání věku a skóre mezi skupinami byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Pro parametrická data byl užit χ^2 test.

5.1.3. Výsledky

Celkově bylo zhodnoceno 66 pacientů. Léčebná odpověď byla pozorována u 45 (68 %) pacientů, selhání BCG léčby u 21 (32 %) pacientů. Ve skupině selhání se jednalo o rekurenci onemocnění u 15 (23 %) pacientů a progresi onemocnění u 6 (9 %) pacientů. 3 (5 %) pacienti zemřeli na karcinom močové měchýře. Průměrná doba do selhání BCG terapie byla 10 měsíců.

Obě skupiny pacientů s tumory (BCG odpověď i selhání) byly homogenní, bez statisticky významných odchylek. Mezi oběma skupinami BCG nebyl signifikantní rozdíl v pohlaví, velikosti tumoru, přítomnosti CIS a kuřáctví. BCG selháním bylo spojené s vyšším skóre rekurence ($p=0,0109$). Skóre progresu nebylo spojeno se statistickou signifikací s BCG selháním v naší skupině pacientů ($p=0,188$). Data jsou prezentována tabulkou (Tab. 1).

Tab. 1: Demografická charakteristika obou podskupin pacientů

Charakteristika	BCG selhání (n=16)	BCG odpověď (n=41)	kontrola (n=13)	p^1	p^2
Věk (průměr)	68 (51-79)	67 (42-84)	67 (60-73)	0,903	0,901
Kouření n (%)	8 (50 %)	30 (73 %)	11 (85 %)	0,325	0,0619
Mužské pohlaví n (%)	13 (81 %)	34 (83 %)	11 (85 %)	1,00	1,00
Velikost tumoru nad 3cm n (%)	7 (44 %)	22 (54 %)	-	-	0,770
Skóre rekurence (průměr)	10 (6-13)	8 (2-12)	-	-	0,0109
Skóre progresu (průměr)	14 (10-20)	12 (5-20)	-	-	0,188
Přítomnost CIS n (%)	5 (31 %)	14 (34 %)	-	-	1,00

p^1 - porovnání mezi kontrolní skupinou a pacienty s nádory (obě podskupiny).

p^2 - porovnání mezi skupinou pacientů se selháním a odpovědi na léčbu

5.1.4. Závěr

V našem souboru pacientů byl potvrzen dobrý klinický efekt BCG instilační terapie u pacientů *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře. Meta-analýzy klinických studií

potvrdily příznivý efekt léčby BCG ve srovnání jen se samotnou endoresekcí tumoru či endoresekcí spojenou s instilační chemoterapií. BCG terapie snižuje u této skupiny pacientů riziko progresu až o 27 %. Bez léčby, až 54 % pacientů s CIS progreduje v invazivní karcinom močového měchýře. U našich pacientů nebyla spojena přítomnost CIS ani vyšší skóre progresu s vyšším rizikem selhání léčby, což neodpovídá očekávaným předpokladům. Vysvětlením může být pravděpodobně nedostatečná velikost souboru.

5.2. Studium epigenetických změn ve tkáni *high grade* NMIBC a CIS

5.2.1. Cíl

Na onkogenezi nádorového onemocnění se podílí více faktorů. Mezi zásadní patří změny genetické a epigenetické výbavy mateřské uroteliální buňky. Jednou z nejčastěji studovaných epigenetických změn je metylace DNA. Cílem této části výzkumu bylo ověřit dopad známých vybraných metylací supresorových genů na rozvoj karcinomu močového měchýře či odhalení nových tumor supresorových genů, jejichž metylace se podílí v procesu karcinogeneze karcinomu močového měchýře.

5.2.2. Soubor a metoda

V archivu patologického ústavu byly vyhledány vzorky tumorů všech 66 pacientů s *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře, kteří splnili definované podmínky pro zařazení do studie. Reprezentativní vzorek tumoru byl následně předán biochemikům k epigenetickému zpracování. Kontrolní tkáň, normální (nemaligní) sliznice močového měchýře, byla získána od 13 pacientů, kteří podělali cystektomií pro nemaligní (např. píštěl) či maligní (tumor části měchýře) indikaci. Výzkumní záměr byl schválen Etickou komisí našeho pracoviště. Z dodané tkáně tumoru a kontrolní tkáně byla unikátní metodou izolovaná DNA, která byla následně využita pro samotnou epigenetickou analýzu. Z palety možných epigenetických změn byla na základě literárního průzkumu a dostupnosti laboratorních metod zvolena analýza změn metylací DNA v nádorové tkáni. Pro samotnou metylační analýzu byla zvolena metoda Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA). K dosažení cíle bylo nutno porovnat výsledky metylační analýzy mezi tumorózní tkání a kontrolní nepostíženou tkání. Pro porovnání výskytu genů mezi skupinami byl použit Fisherův přesný test rozdílu dvou relativních hodnot. Jako signifikantní byla určena *p-value* <0.05. Byla užita Bonferroniho modifikace signifikace.

Izolace DNA

Parafinové vzorky tumoru močového měchýře byly získány z archivu patologické kliniky. Všechny vzorky byly připraveny a zkontrolovány zkušeným patologem. Podmínkou zařazení do kontrolní skupiny byla makroskopicky i mikroskopicky normální sliznice močového měchýře. Touto selekcí prošla pouze 1/3 získaných vzorků. Vzorky byly získány na základě informovaného souhlasu získaného od pacienta před plánovaným výkonem. DNA byla izolována z tkáňových vzorků fixovaných ve formalínu, zalitých v parafínu pomocí Qiagen DNA extrakčního kitu (Hilden, Germany) dle protokolu výrobce s minimem úprav (Obr. 21). Izolace DNA z tkáňových vzorků fixovaných ve formalínu, zalitých v parafínu se skládá z 6-ti základních kroků. Prvním krokem je odstranění parafínu jeho rozpuštěním v xylenu. Dalším krokem je lýza vzorku působením proteinázy K (56 °C, přes noc). Třetím krokem je inkubace při 70 °C (10 minut), při níž dochází ke zvrácení formalínem vyvolaného zesíťování. Následuje navázání DNA na membránu a odstranění kontaminujících nečistot.

Posledním šestým krokem je eluování koncentrované DNA z membrány. Měření koncentrace izolované DNA bylo provedeno dle protokolu výrobce pomocí dvou technik: fluorimetricky (Qubit, Invitrogen) a spektrofotometricky (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific).

Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA)

V naší práci byly použity dva MS-MLPA kity: ME001 a ME004 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), které mohou analyzovat atypickou metylaci u několika tumor supresorových genů (Tab. 2). Sekvence prob, genová místa a pozice na chromozómu mohou být nalezeny na <http://www.mlpa.com>. Metylace jednotlivých genů byla stanovena pomocí dvou prob, které obsahovaly různá HhaI restriční místa. Experimentální postup byl proveden podle protokolu výrobce, s minimem modifikací.

Tab. 2: Vybrané geny pro metylační analýzu: MS-MLPA (KIT ME001 a KIT ME004)

Gen	Název	Sondy	Lokus chromozomu
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	02255-L03752	22q12.3
APC	Adenomatous polyposis coli	01905-L01968	5q22.2
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	01524-L01744	9p21.3
MLH1 (a)	MutL homolog 1	01686-L01266	3p22.2
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	04044-L03849	11q22.3
RARB	Retinoic acid receptor, beta	04040-L01698	3p24.2
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	00607-L00591	9p21.3
HIC1	Hypermethylated in cancer 1	03804-L00949	17p13.3
CHFR	Checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase	03813-L03753	12q24.33
BRCA1	Breast cancer 1	05162-L04543	17q21.31
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	02761-L02210	2q33.1
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	07949-L07730	12p13.1
KLLN	Killin, p53-regulated DNA replication inhibitor	02203-L08261	10q23.3
BRCA2	Breast cancer 2	04042-L03755	13q12.3
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	03817-L01731	11p13
RASSF1 (a)	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	02248-L01734	3p21.31
DAPK1	Death-associated protein kinase 1	01677-L01257	9q21.33
VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor	03810-L01211	3p25.3
ESR1	Estrogen receptor 1	02202-L01700	6q25.1
RASSF1 (b)	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	03807-L02159	3p21.31
TP73	Tumor protein p73	04050-L01263	1p36.32

FHIT	Fragile histidine triad	02201-L01699	3p14.2
IGSF4	Cell adhesion molecule 1	03819-L03848	11q23.3
CDH13	Cadherin 13, H-cadherin	07946-L07727	16q23.3
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	01638-L01176	11q13.2
MLH1 (b)	MutL homolog 1	02260-L01747	3p22.2
EPHB2	Ephrin receptor B2	07910-L07623	1p36.1
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	10344-L10882	18q21.3
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	10345-L11988	10q23.3
NF1 (a)	Neurofibromin 1	03845-L03318	17q11.2
RARRES1	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	03308-L13245	3q25
TERT	Telomerase reverse transcriptase	10346-L10884	5p15.3
THBS1	Thrombospondin 1	02739-L02166	15q15
SFRP1 (a)	Secreted frizzled-related protein 1	10564-L13246	8p11.2
IGF2R (a)	Insulin-like growth factor 2 receptor	02800-L02185	6q26
NF1 (b)	Neurofibromin 1	03844-L03317	17q11.2
TWIST1	Twist homolog 1	07015-L06626	7p21.2
APAF1 (a)	Apoptotic peptidase activating factor 1	09165-L09458	12q23.1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	03955-L03394	20p12.3
DNAJC15	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15	03297-L02661	13q14.1
NTRK1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	03970-L03357	1q23.1
PXMP4 (a)	Peroxisomal membrane protein 4	03303-L13247	20q11.2
MEN1 (a)	Multiple endocrine neoplasia I	09168-L09461	11q13.1
LMNA	Lamin A/C	12287-L13799	1q22
APAF1 (b)	Apoptotic peptidase activating factor 1	09166-L09459	12q23.1
PCCA	Propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide	08676-L08688	13q32.3
PAX6	Paired box 6	03748-L03208	11p13
RBM14	RNA binding motif protein 14	09429-L09678	11q13
MUS81 (a)	MUS81 endonuclease homolog	09157-L09315	11q13.1
IGF2R (b)	Insulin-like growth factor 2 receptor	02801-L02186	6q26
SFRP1 (b)	Secreted frizzled-related protein 1	10563-L11109	8p11.2
GATA4	GATA binding protein 4	03754-L13255	8p23.1
PXMP4 (b)	Peroxisomal membrane protein 4	03304-L13248	20q11.2
MEN1 (b)	Multiple endocrine neoplasia I	09167-L09460	11q13.1
MUS81 (b)	MUS81 endonuclease homolog	10574-L09314	11q13.1
WIF1	WNT inhibitory factor 1	10361-L10899	12q14.3

V krátkosti, DNA (100 ng) byla rozpuštěna v 5 μ l TE-pufu (10 mM Tris·Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0), denaturována a následně ochlazena na 25 °C. Po přidání směsi prob, byly proby přes noc hybridizovány (16-18 hodin) při 60 °C. Následně byly vzorky rozděleny na dva podíly: jedna polovina vzorku byla přímo ligována, zatímco druhá polovina vzorku byla společně s ligázou vystavena působení restriční endonukleázy HhaI (30 minut při 49 °C). Toto štěpení způsobilo ligaci pouze nenaštěpené (metylované) DNA sekvence. Amplifikační PCR reakce byla provedena ve standardním termocykléru (GeneAmp 9700, Applied Biosystems) a využívala teplotní profil: 35 cyklů denaturace při 95 °C 30 s, *annealing* při 60 °C 30 s a extenze při 72 °C 1 minutu, zakončeno závěrečnou extenzí 20 minut při 72 °C. Alikvoty PCR reakce (0,6 μ l) byly smíchány s 0,2 μ l vnitřního standardu GeneScan™ –500 LIZ® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 9,0 μ l formamidu. Po denuraci byly fragmenty separovány a kvantifikovány na ABI3130 kapilárním sekvenátoru a analyzovány pomocí GeneMapper 4,0 (oba Applied Biosystems). Plochy píků s odpovídající velikostí párů bází (bp) byly použity pro další zpracování dat. Poměr metylace byl získán následujícím výpočtem: $Dm = (Px / Pctrl) Dig / (Px / Pctrl) Undig$, kde Dm je poměr metylace, Px je plocha píku dané sondy, Pctrl je součet ploch píků všech kontrolních sond, Dig znamená HhaI štěpený vzorek a Undig neštěpený vzorek. Dm se může pohybovat od 0 do 1,0 (odpovídá 0 % -100 % metylované DNA). Na základě předchozích experimentů jsme považovali promotor za metylovaný, pokud $Dm \geq 0,2$, což odpovídá 20 % metylované DNA. CpG univerzálně metylovaná a nemetylovaná DNA (Zymoresearch, Irvine, CA, USA) byly použity v každém běhu jako kontroly.

5.2.3. Výsledky

Kompletní nebo částečná metylační analýza byla provedena u 57 pacientů s tumorem měchýře a 13 kontrolních pacientů. Izolace DNA byla neúspěšná u 9 pacientů, kde tedy metylační analýzu nebylo možno provést. U povrchového *high grade* karcinomu močového měchýře byly zjištěny změny metylací v porovnání s kontrolní tkání u těchto genů: WIF1, GATA4, TERT, BLC2, CDH13, RASSF1a, RASSF1b, TP73, CDKN2B, APC, TWIST1, PTEN, SFRP1b. Zcela nově byly námi identifikovány změny metylací genů MUS81a, NTRK1 a PCCA.

5.2.4. Závěr

Genetické a epigenetické změny hrají důležitou roli v rozvoji karcinomu močového měchýře. Odhalení metylací nových tumor supresorových genů, které se podílejí na procesu karcinogenezi karcinomu močového měchýře, může vést k hlubšímu pochopení těchto změn a ke zlepšení diagnostiky i léčby této život ohrožující choroby. V naší práci jsme nově prokázali signifikantní změny metylací genů MUS81a, NTRK1 a PCCA jež nebyly prokázány ve zdravé uroteliální tkáni. Změny metylací DNA v nádorových buňkách se jeví jako velmi nadějně téma dalšího vědeckého výzkumu.

5.3. Hledání epigenetického markeru predikujícího léčebnou odpověď BCG vakcíny v léčbě *high grade* NMIBC a CIS

5.3.1. Cíl

Při našem výzkumu byly jednoznačně prokázány rozdíly v metylaci DNA nádorových, uroteliálních buněk ve srovnání se zdravým urotelem. Úroveň metylačních změn u *high grade* a CIS karcinomu močového měchýře není homogenní. Otevírá se otázka, zda různé úrovně těchto změn mohou mít klinický dopad na biologické chování nádoru, odpověď na podávanou léčbu či prognózu onemocnění. Dominantní nechirurgickou metodu *high grade* a CIS karcinomu močového měchýře je intravezikální aplikace BCG vakcíny. Cílem naší práce bylo ověřit hypotézu, že přítomnost či absence námi vybraných genů koreluje s klinickou odpovědí na podanou BCG léčbu.

5.3.2. Soubor a metoda

Byla provedena statistická analýza dat 57 pacientů s *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře, u kterých byla úspěšně dokončena metylační analýza (viz kapitola 3.3.). Tento základní soubor byl rozdělen na základě znalostí dalšího vývoje onemocnění po podání BCG vakcíny. Soubor byl rozdělán na skupinu s dobrou odpovědí na BCG léčbu (n=41) a s BCG selháním (n=16). Statistickými metodami byly hodnoceny rozdíly metylačních změn DNA mezi oběma skupinami. Pro porovnání výskytu genů mezi skupinami byl použit Fisherův přesný test rozdílu dvou relativních hodnot. Jako signifikantní byla určena *p-value* <0,05. Byla užita Bonferroniho modifikace signifikace.

5.3.3. Výsledky

Ze všech 56 analyzovaných genů byly odhaleny signifikantní změny metylací u dvou genů. Nepřítomnost metylací genů CDKN2B ($p=0,00312^{**}$) a MUS81a ($p=0,0191^{*}$) byla spojena se selháním BCG léčby.

5.3.4. Závěr

Na základě výstupu naší práce a dosud publikovaných dat, mají změny metylací vybraných tumor supresorových genů potenciál v předpovědi léčebné odpovědi BCG instilační terapie, u pacientů s povrchovým *high grade* karcinomem močového měchýře⁹². Nicméně zatím je stále málo dat pro bezpečné využití v běžné klinické praxi. Metylace tumor supresorových genů jako PMF-1, MSH6, THBS1, CDKN2B a MUS81 jsou velmi nadějně pro další výzkum.

6. Použitá literatura

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9.
2. Vařečková K, Povová J, Janout V. Epidemiologie karcinomu močového měchýře. *Urol. praxi*, 2013; 14(3): 104–108.

3. Babjuk M, Matoušková M, Finek J, Petruželka L. Konsenzuální doporučené postupy v uroonkologii. Praha: Galén 2009. IBSN 978-80-7262-639-7.
4. Olfert SM, Felknor SA, Delclos GL. An updated review of the literature: risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures. *South Med J.* 2006 Nov;99(11):1256-
5. <http://www.svod.cz>
6. Compérat E, Larré S, Roupert M, Neuzillet Y, Pignot G, Quintens H, Houéde N, Roy C, Durand X, Varinot J, Vordos D, Rouanne M, Bakhri MA, Bertrand P, Jeglinski SC, Cussenot O, Soulié M, Pfister C. Clinicopathological characteristic of urothelial bladder cancer in patient less than 40 year sold. *Virchows Arch.* 2015 May;466(5):589-94. doi: 10.1007/s00428-015-1739-2. Epub 2015 Feb 20.
7. Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol Oncol.* 2012 Mar-Apr;30(2):199-211. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.10.010.
8. Silverman DR, Morrison AS, Devesa SS. *Cancer Epidemiology and Prevention. Second Edition.* New York: Oxford University Press 1996. ISBN 0-19-505050-0.
9. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol.* 2013 Feb;63(2):234-41. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033. Epub 2012 Jul 25
10. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA.* 2011 Aug 17;306(7):737-45. doi: 10.1001/jama.2011.1142.
11. Katolická J, Hrubá D. Faktory ovlivňující vznik karcinomu močového měchýře. *Urolog. pro Praxi,* 2003; 4: 142-144.
12. Murta-Nascimento C, Schmitz-Dräger BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX, Malats N. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J Urol.* 2007 Jun;25(3):285-95.
13. Egbers L, Grotenhuis AJ, Aben KK, Alfred Witjes J, Kiemeny LA, Vermeulen SH. The prognostic value of family history among patients with urinary bladder cancer. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):1117-24. doi: 10.1002/ijc.29062. Epub 2014 Jul 9.
14. Green J, Banks E, Berrington A, Darby S, Deo H, Newton R. N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: an overview and consideration of the evidence for gene-environment interaction. *Br J Cancer.* 2000 Aug;83(3):412-7.
15. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, Compton C, Brierley J, Groome PA. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer.* 2014 Jul 15;135(2):371-8.
16. Chalasani V, Chin JL, Izawa JJ. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. *Can Urol Assoc J.* 2009 Dec;3(6 Suppl 4):S193-8.
17. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016 Jul;70(1):106-119. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.028. Epub 2016 Mar 17

18. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Conference Committee. *Am J Surg Pathol*. 1998 Dec;22(12):1435-48.
19. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol*. 2007 Apr;51(4):889-97; discussion 897-8. Epub 2006 Oct 27.
20. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, Torres A, Watson R, Kurth KH. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology*. 2005 Dec;66(6 Suppl 1):90-107.
21. Lamm DL. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am*. 1992 Aug;19(3):499-508.
22. Lamm DL, Herr H, Jakse G, Kuroda M, Mostofi FK, Okajima E, Sakamoto A, Sesterhenn I, da Silva FC. Updated concepts and treatment of carcinoma in situ. *Urol Oncol*. 1998 Jul-Oct;4(4-5):130-8.
23. Nolte-Ernsting C, Cowan N. Understanding multislice CT urography techniques: Many roads lead to Rome. *Eur Radiol*. 2006 Dec;16(12):2670-86. Epub 2006 Sep 5.
24. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*. 2009 Jun;22 Suppl 2:S53-9. doi: 10.1038/modpathol.2008.193.
25. Raitanen MP, Aine R, Rintala E, Kallio J, Rajala P, Juusela H, Tammela TL; FinnBladder Group. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol*. 2002 Mar;41(3):284-9.
26. Kurth KH, Schellhammer PF, Okajima E, Akdas A, Jakse G, Herr HW, Calais da Silva F, Fukushima S, Nagayama T. Current methods of assessing and treating carcinoma in situ of the bladder with or without involvement of the prostatic urethra. *Int J Urol*. 1995 Jun;2 Suppl 2:8-22.
27. van der Aa MN, Steyerberg EW, Bangma C, van Rhijn BW, 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 Jan;183(1):76-80. doi: 10.1016/j.juro.2009.08.150.
28. van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*. 2005 Jun;47(6):736-48. Epub 2005 Mar 23.
29. Lotan Y, Shariat SF, Schmitz-Dräger BJ, Sanchez-Carbayo M, Jankevicius F, Racioppi M, Minner SJ, Stöhr B, Bassi PF, Grossman HB. Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urol Oncol*. 2010 Jul-Aug;28(4):441-8. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.11.004.

30. Yutkin V, Nisman B, Pode D. Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance? *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010 Jun;10(6):787-90. doi: 10.1586/era.10.75.
31. Mariappan P, Zachou A, Grigor KM. 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. doi: 10.1016/j.eururo.2009.05.047. Epub 2009 Jun 6
32. Gupta NP, Saini AK, Dogra PN, Seth A, Kumar R. Bipolar energy for transurethral resection of bladder tumours at low-power settings: initial experience. *BJU Int.* 2011 Aug;108(4):553-6. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09903.x. Epub 2010 Dec 22.
33. Baltacı S, Bozlu M, Yıldırım A, Gökçe Mİ, Tinay İ, Aslan G, Can C, Türkeri L, Kuyumcuoğlu U, Mungan A. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int.* 2015 Nov;116(5):721-6. doi: 10.1111/bju.13102. Epub 2015 May 11.
34. Král M, Hradil D, Kudláčková Š, Vidlář A, Študent V. Nové možnosti diagnostiky a predikce prognózy nádorů močového měchýře. *Urol. praxi*, 2017; 18(2): 64-68
35. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, Nabi G, Boachie C, Cook JA, Fraser C, Griffiths TR. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care.* 2011 Jan;27(1):3-10. doi: 10.1017/S0266462310001364. Epub 2011 Jan 25.
36. Burger M, Grossman HB, Droller M, Schmidbauer J, Hermann G, Drăgoescu O, Ray E, Fradet Y, Karl A, Burgués JP, Witjes JA, Stenzl A, Jichlinski P, Jocham D. Photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer with hexaminolevulinate cystoscopy: a meta-analysis of detection and recurrence based on raw data. *Eur Urol.* 2013 Nov;64(5):846-54. doi: 10.1016/j.eururo.2013.03.059. Epub 2013 Apr 8.
37. Cauberg EC, Kloen S, Visser M, de la Rosette JJ, Babjuk M, Soukup V, Pesl M, Duskova J, de Reijke TM. Narrow band imaging cystoscopy improves the detection of non-muscle-invasive bladder cancer. *Urology.* 2010 Sep;76(3):658-63. doi: 10.1016/j.urology.2009.11.075. Epub 2010 Mar 12.
38. Oosterlinck W, Kurth KH, Schröder F, Bultinck J, Hammond B, Sylvester R. A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1993 Apr;149(4):749-52.

39. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, Sydes MR, Birtle A, Gudjonsson S, De Nunzio C, Okamura K, Kaasinen E, Solsona E, Ali-El-Dein B, Tatar CA, Inman BA, N'Dow J, Oddens JR, Babjuk M. 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 Feb;69(2):231-44. doi: 10.1016/j.eururo.2015.05.050. Epub 2015 Jun 16.
40. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Huguet-Pérez J. Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. *J Urol.* 2000 Oct;164(4):1183-7.
41. Čermák A, Pacík D, Vít V. Kontinentní a inkontinentní derivace moči, měchýř šetřící postupy. *Urol List* 2012; 10(3): 34-43.
42. Svobodová J. Vakcinační kmen *Mycobacterium bovis* BCG a očkování proti tuberkulóze. *ZPRÁVY CENTRA EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE (SZÚ, PRAHA)* 2014; 23(5)
43. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine.* 1999 Feb 26;17(7-8):915-22.
44. 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 Nov;168(5):1964-70.
45. Pearl R. Cancer and tuberculosis. *Am J Hygiene.* 1929;9:97-159.
46. Zbar B, Bernstein ID, Bartlett GL, Hanna MG Jr, Rapp HJ. Immunotherapy of cancer: regression of intradermal tumors and prevention of lymph node metastases after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. *J Natl Cancer Inst.* 1972 Jul;49(1):119-30.
47. Coe JE, Feldman DJ. Extracutaneous delayed hypersensitivity, particularly in the guinea-pig bladder. *Immunology.* 1966 Feb; 10(2): 127-136.
48. Bloomberg SD, Brosman SA, Hausman MS, Cohen A, Battenberg JD. The effects of BCG on the dog bladder. *Invest Urol.* 1975 May;12(6):423-7.
49. Morales A, Eiding D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976 Aug;116(2):180-3.
50. Lamm DL, Thor DE, Harris SC, Reyna JA, Stogdill VD, Radwin HM. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer. *J Urol.* 1980 Jul;124(1):38-40.
51. Drake T, Hicks J. BCG in bladder cancer: The morales of the story. *Eur Urol Suppl* 2014;13:e334.
52. Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol.* 2008 Jan;179(1):53-6. Epub 2007 Nov 13.
53. Kavoussi LR, Brown EJ, Ritchey JK, Ratliff TL. Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response. *J Clin Invest.* 1990 Jan;85(1):62-7.

54. Luo Y, Chen X, O'Donnell MA. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN-gamma production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine*. 2003 Jan 7;21(1):17-26.
55. Matoušková M. Imunoterapie uroteliálního karcinomu močového měchýře-od BCG vakcíny k cílené imunoterapii. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 4S95–4S102
56. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E, Solsona E, Di Stasi SM, Witjes JA. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2009 Aug; 56(2):247-56. doi: 10.1016/j.eururo.2009.04.038. Epub 2009 Apr 24.
57. Han RF, Pan JG. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology*. 2006 Jun; 67(6):1216-23.
58. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD. Intravesical bacillus Calmette-Guérin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU Int*. 2004 Mar; 93(4):485-90.
59. Böhle A, Jocham D, Bock PR Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *Urol*. 2003 Jan; 169(1):90-5.
60. Zlotta AR, van Vooren JP, Huygen K, Drowart A, Decock M, Pirson M, Jurion F, Palfliet K, Denis O, Simon J, Schulman CC. What is the optimal regimen for BCG intravesical therapy? Are six weekly instillations necessary? *Eur Urol*. 2000 Apr; 37(4):470-7.
61. Oddens J, Brausi M, Sylvester R, Bono A, van de Beek C, van Andel G, Gontero P, Hoeltl W, Turkeri L, Marreaud S, Collette S, Oosterlinck W. Final results of an EORTC-GU cancers group randomized study of maintenance bacillus Calmette-Guérin in intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the urinary bladder: one-third dose versus full dose and 1 year versus 3 years of maintenance. *Eur Urol*. 2013 Mar;63(3):462-72. doi: 10.1016/j.eururo.2012.10.039. Epub 2012 Nov 2.
62. Martínez-Piñeiro L, Portillo JA, Fernández JM, Zabala JA, Cadierno I, Moyano JL, Solsona E, Unda M, Beardo P, Rodríguez-Molina J, Chantada V, Palou J, Muntañola P, Alonso Dorrego JM, Pérez-García FJ, Silva JM, Chesa N, Montesinos M, Ojea A, Madero R, Martínez-Piñeiro JA. Maintenance Therapy with 3-monthly Bacillus Calmette-Guérin for 3 Years is Not Superior to Standard Induction Therapy in High-risk Non-muscle-invasive Urothelial Bladder Carcinoma: Final Results of Randomised CUETO Study 98013. *Eur Urol*. 2015 Aug;68(2):256-62. doi: 10.1016/j.eururo.2015.02.040. Epub 2015 Mar 18.
63. Herr HW, Milan TN, Dalbagni G. BCG-refractory vs. BCG-relapsing non-muscle-invasive bladder cancer: a prospective cohort outcomes study. *Urol Oncol*. 2015 Mar;33(3):108.e1-4. doi: 10.1016/j.urolonc.2014.02.020.

64. Takenaka A, Yamada Y, Miyake H, Hara I, Fujisawa M. Clinical outcomes of bacillus Calmette-Guérin instillation therapy for carcinoma in situ of urinary bladder. *Int J Urol*. 2008 Apr;15(4):309-13. doi: 10.1111/j.1442-2042.2008.02012.x.
65. Kaasinen E, Wijkström H, Malmström PU, Hellsten S, Duchek M, Mestad O, Rintala E. Alternating mitomycin C and BCG instillations versus BCG alone in treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder: a nordic study. *Eur Urol*. 2003 Jun;43(6):637-45.
66. Solsona E, Iborra I, Ricós JV, Monrós JL, Dumont R, Almenar S. Extravesical involvement in patients with bladder carcinoma in situ: biological and therapy implications. *J Urol*. 1996 Mar;155(3):895-9; discussion 899-900.
67. Daniels MJ, Barry E, Schoenberg M, Lamm DL, Bivalacqua TJ, Sankin A, Kates M. Contemporary oncologic outcomes of second induction course BCG in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *Urol Oncol*. 2019 Jun 26. pii: S1078-1439(19)30218-2. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.05.018. [Epub ahead of print]
68. Herr HW¹, Dalbagni G. Defining bacillus Calmette-Guerin refractory superficial bladder tumors. *J Urol*. 2003 May;169(5):1706-8.
69. Zahoor H, Mir MC, Barata PC, Stephenson AJ, Campbell SC, Fergany A, Dreicer R, Garcia JA. Phase II trial of continuous treatment with sunitinib in patients with high-risk (BCG-refractory) non-muscle invasive bladder cancer. *Invest New Drugs*. 2019 Dec;37(6):1231-1238. doi: 10.1007/s10637-018-00716-w. Epub 2019 Jun 24.
70. Mangrud OM, Waalen R, Gudlaugsson E, Dalen I, Tasdemir I, Janssen EA, Baak JP. Reproducibility and prognostic value of WHO1973 and WHO2004 grading systems in TaT1 urothelial carcinoma of the urinary bladder. *PLoS One*. 2014 Jan 7;9(1):e83192. doi: 10.1371/journal.pone.0083192. eCollection 2014.
71. Sengiku A, Ito M, Miyazaki Y, Sawazaki H, Takahashi T, Ogura K. A prospective comparative study of intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy with the Tokyo or Connaught strain for nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol*. 2013 Jul;190(1):50-4. doi: 10.1016/j.juro.2013.01.084. Epub 2013 Jan 30.
72. Brausi M, Oddens J, Sylvester R, et al. Side effects of bacillus Calmette-Guerin (BCG) in the treatment of intermediate and high risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: results of EORTC Genito-Urinary Cancer Group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose and 1 year with 3 years of maintenance BCG. *Eur Urol* 2014; 65(1):69-76.
73. SUKL, SPC přípravku BCG-MEDAC PRÁŠEK SUS. K INSTILACI DO MOČ. MĚCHÝŘE S ROZP.(online)(cit:12.9.2018).Dostupnéz:<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.hpd?kod=0185261>
74. Oddens JR, Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, van de Beek C, van Andel G, de Reijke TM, Prescott S, Alfred Witjes J, Oosterlinck W. Increasing age is not associated with toxicity

leading to discontinuation of treatment in patients with urothelial non-muscle-invasive bladder cancer randomised to receive 3 years of maintenance bacille Calmette-Guérin: results from European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group study 30911. *BJU Int.* 2016 Sep;118(3):423-8. doi: 10.1111/bju.13474. Epub 2016 Apr 2.

75. Babjuk M, Soukup V. Intravezikální léčba povrchových nádorů močového měchýře. *Urolog. pro Praxi*, 2004; 3: 116-120

76. Lamm DL¹, van der Meijden PM, Morales A, Brosman SA, Catalona WJ, Herr HW, Soloway MS, Steg A, Debruyne FM. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J Urol.* 1992 Mar;147(3):596-600.

77. Palou J, Rodríguez-Villamil L, Andreu-Crespo A, Salvador-Bayarri J, Vicente-Rodríguez J. Intravesical treatment of severe bacillus Calmette-Guerin cystitis. *Int Urol Nephrol.* 2001;33(3):485-9.

78. Falkensammer C, Gozzi C, Hager M, Maier H, Bartsch G, Hörtl L, Rehder P. Late occurrence of bilateral tuberculous-like epididymo-orchitis after intravesical bacille Calmette-Guérin therapy for superficial bladder carcinoma. *Urology.* 2005 Jan;65(1):175.

79. Kabukari K, Sugino K, Sekiya M, Takai Y, Shibuya K, and Homma S. Miliary Tuberculosis that Developed after Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Therapy. *Intern Med.* 2017 Jun 15; 56(12): 1563–1567. doi: 10.2169/internalmedicine.56.8055

80. Callaris G, Marra G, Corcione S, Oderda M, Cardellino C, Audagnotto S, Frea B, De Rosa FG, Gontero P. Miliary pulmonary infection after BCG intravesical instillation: a rare, misdiagnosed and mistreated complication. *Infez Med.* 2017 Dec 1;25(4):366-370.

81. Rodríguez F, Palou J, Martínez R, Rodríguez O, Rosales A, Huguet J, Villavicencio H. [Practical guideline for the management of adverse events associated with BCG installations]. *Arch Esp Urol.* 2008 Jun;61(5):591-6.

82. Talbot EA, Perkins MD, Silva SF, Frothingham R. Disseminated bacille Calmette-Guérin disease after vaccination: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1997 Jun;24(6):1139-46.

83. Batista M, Alves C, Boinas C, Camacho E. Tuberculosis Miliary in Patients Treated With Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy: Case Report. *J Med Cases.* 2017;8(7):233-235 doi: <https://doi.org/10.14740/jmc2862w>

84. Witjes JA, Paulo J, Soloway M, Lamm D, Kamat AM, Brausi M. Clinical practice recommendations for the prevention and management of intravesical therapy-associated adverse events. *Eur Urol Suppl* 2008 Oct;7(10):667-76.

85. Elkabani M, Gree JN, Vincent AL, VanHook S, Sandin RL. Disseminated Mycobacterium bovis after intravesicular bacillus calmette-Guerin treatments for bladder cancer. *Cancer Control* 2000; 7:476

86. Nechanská B, Zaplatílek J, Pabišta R, Zdražilová O. Miliární BCG – pneumonitida: vzácná komplikace intravezikální terapie BCG. *Ces Urol* 2019, 23(2):140-148

87. Masopust J. Epigenetické alterace a jejich klinický význam. Labor aktuell: časopis pro klienty Roche Diagnostics v České a Slovenské republice. Praha: Roche, 2003. ISSN 1214-7672.
88. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. 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 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7. Epub 2006 Jan 17.
89. Chmelarova M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Beranek M, Palicka V. Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer. *Clin Transl Oncol.* 2013 Feb;15(2):160-3. doi: 10.1007/s12094-012-0894-z. Epub 2012 Jul 19.
90. Chmelařová M, Křepinská E, Spaček J, Laco J, Nekvindová J, Palička V. Methylation analysis of tumour suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA. *Folia Biol (Praha).* 2012;58(6):246-50.
91. Pavicic W, Perkiö E, Kaur S, Peltomäki P. Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol Med.* 2011;17(7-8):726-35. doi: 10.2119/molmed.2010.00239. Epub 2011 Feb 9
92. Dvorakova E, Chmelarova M, Laco J, Palicka V, Spacek J. Methylation analysis of tumor suppressor genes in endometrioid carcinoma of endometrium using MS-MLPA. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013 Dec;157(4):298-303. doi: 10.5507/bp.2013.035. Epub 2013 May 29.
93. Husek P, Pacovsky J, Chmelarova M, Podhola M, Brodak M. Methylation status as a predictor of intravesical Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy response of high grade non-muscle invasive bladder tumor. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017 Jun;161(2):210-216. doi: 10.5507/bp.2017.008. Epub 2017 Mar 22.
94. van der Meijden AP, Sylvester RJ, Oosterlinck W, Hoeltl W, Bono AV; EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Group. Maintenance Bacillus Calmette-Guerin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur Urol.* 2003 Oct;44(4):429-34.
95. Kulkarni GS, Hakenberg OW, Gschwend JE, Thalmann G, Kassouf W, Kamat A, Zlotta A. An updated critical analysis of the treatment strategy for newly diagnosed high-grade T1 (previously T1G3) bladder cancer. *Eur Urol.* 2010 Jan;57(1):60-70. doi: 10.1016/j.eururo.2009.08.024. Epub 2009 Sep 1.
96. Cabello MJ, Grau L, Franco N, Orenes E, Alvarez M, Blanca A, Heredero O, Palacios A, Urrutia M, Fernández JM, López-Beltrán A, Sánchez-Carbayo M. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *J Mol Diagn.* 2011 Jan;13(1):29-40. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.008. Epub 2010 Dec 23.
97. García-Baquero R, Puerta P, Beltran M, Alvarez-Mújica M, Alvarez-Ossorio JL, Sánchez-Carbayo M. Methylation of tumor suppressor genes in a novel panel predicts clinical outcome

in paraffin-embedded bladder tumors. *Tumour Biol.* 2014 Jun;35(6):5777-86. doi: 10.1007/s13277-014-1767-6. Epub 2014 Feb 28.

98. Ibragimova I, Dulaimi E, Slifker MJ, Chen DY, Uzzo RG, Cairns P. A global profile of genes promoter methylation in treatment-naïve urothelial cancer. *Epigenetics.* 2014

99. Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA. Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2473-6.

100. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002 Feb;8(2):464-70.

101. Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Cheng JC, Toma MI, Huland H, Jones PA, Liang G. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005 Nov;41(17):2769-78. Epub 2005 Oct 19.

102. Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, Patterson J, Cross SS, Feeley KM, Stephenson Y, Meuth M, Catto JW. Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J Pathol.* 2006 Jul;209(3):336-43.

103. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1;13(7):2046-53.

104. Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaitė K, Suziedelis K, Mutanen P, Husgafvel-Pursiainen K. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology.* 2008;75(3-4):145-51. doi: 10.1159/000158665. Epub 2008 Sep 29.

105. Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K, Kawashima K, Laird PW, Jones PA, Liang G. Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):8169-78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1335. Epub 2010 Sep 14.

106. Agundez M, Grau L, Palou J, Algaba F, Villavicencio H, Sanchez-Carbayo M. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *Eur Urol.* 2011 Jul;60(1):131-40. doi: 10.1016/j.eururo.2011.04.020. Epub 2011 Apr 16.

107. Alvarez-Múgica M, Fernández-Gómez JM, Cebrian V, Fresno F, Escaf S, Sánchez-Carbayo M. Polyamine-modulated factor-1 methylation predicts Bacillus Calmette-Guérin response in patients with high-grade non-muscle-invasive bladder carcinoma. *Eur Urol.* 2013 Feb;63(2):364-70. doi: 10.1016/j.eururo.2012.05.050. Epub 2012 Jun 5.

108. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.* 2001 Dec 15;61(24):8659-63.
109. López F, Sampedro T, Llorente JL, Domínguez F, Hermsen M, Suárez C, Alvarez-Marcos C. Utility of MS-MLPA in DNA methylation profiling in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2014 Apr;50(4):291-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.01.003. Epub 2014 Jan 18.
110. Jiang D, Hong Q, Shen Y, Xu Y, Zhu H, Li Y, Xu C, Ouyang G, Duan S. The diagnostic value of DNA methylation in leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014 May 8;9(5):e96822. doi: 10.1371/journal.pone.0096822. eCollection 2014.
111. Ozdemir F, Altinisik J, Karateke A, Coksuer H, Buyru N. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Exp Ther Med.* 2012 Dec;4(6):1092-1096. Epub 2012 Sep 18.
112. Xing M, Wang X¹, Palmari-Pallag T, Shen H, Helleday T, Hickson ID, Ying S. Acute MUS81 depletion leads to replication fork slowing and a constitutive DNA damage response. *Oncotarget.* 2015 Nov 10;6(35):37638-46. doi: 10.18632/oncotarget.5497.

7. Přehled publikační činnosti autora

- **původní vědecká práce v impaktovaném časopise**

HUŠEK, Petr - PACOVSKÝ, Jaroslav - CHMELARŮVÁ, Marcela - PODHOLA, Miroslav - BROŽÁK, Miloš. Methylation status as a predictor of intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy response of high grade non-muscle invasive bladder tumor. *Biomedical Papers*, 2017, **161**(2), 210-216. ISSN 1213-8118.
IF= 1,087

PACOVSKÝ, Jaroslav - HYŠPLER, Radomír - HUŠEK, Petr - NAVRÁTIL, Pavel - BROŽÁK, Miloš. Colloid Osmotic Pressure Participates on the Post-transplant Lymphocele Pathogenesis. *Transplantation Proceedings*, 2018, **50**(10), 3422-3425. ISSN 0041-1345.
IF= 0,959

BROŽÁK, Miloš - TOMÁŠEK, Jan - PACOVSKÝ, Jaroslav - HOLUB, Lukáš - HUŠEK, Petr. Urological surgery in elderly patients: results and complications. *Clin Interv Aging*, 2015; **10**: 379–385.
IF= 2,585

- **původní vědecká práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise**

HUŠEK, Petr - PACOVSKÝ, Jaroslav - GABALEC, Filip - KOŠINA, Josef - ČÁP, Jan - BROŽÁK, Miloš. Oboustranná adrenalectomie - u pacientů s cushingovým syndromem při ektopické sekreci ACTH. *Česká urologie*, 2012, **16**(1), 67-72. ISSN 1211-8729.

KOŠINA, Josef - PACOVSKÝ, Jaroslav - HUŠEK, Petr - HOLUB, Lukáš - BROŽÁK, Miloš. Tkáňové kyanoakrylátové lepidlo u resekce ledviny – zhodnocení vlastních zkušeností. *Rozhledy v chirurgii*, 2016, **95**(2), 79-82. ISSN 0035-9351.

LOUDA, Miroslav - NĚMEČKOVÁ, E. - BROŽÁK, Miloš - KOŠINA, Josef - PACOVSKÝ, Jaroslav - HOLUB, Lukáš - RÝDEL, L. - KUTÍLEK, Petr - GIBLO, Vladimír - HUŠEK, Petr. Proporcionální zastoupení léčebných postupů u pacientů s benigní hyperplazií prostaty. *Praktický lékař*, 2010, **90**(11), 670-671. ISSN 0032-6739.

PACOVSKÝ, Jaroslav - HUŠEK, Petr - BALÍK, Michal - LOUDA, Miroslav - KOŠINA, Josef - NAVRÁTIL, Pavel - BROŽÁK, Miloš. Biochemický průzkum přítomnosti moči v drénu po chirurgickém výkonu. *Rozhledy v chirurgii*, 2011, **90**(8), 478-481. ISSN 0035-9351.

PACOVSKÝ, Jaroslav - KOŠINA, Josef - HOLUB, Lukáš - NAVRÁTIL, Pavel - HUŠEK, Petr - BROŽÁK, Miloš. Pětileté sledování nemocných po operaci světlobuněčného karcinomu ledviny. *Rozhledy v chirurgii*, 2010, **89**(11), 689-694. ISSN 0035-9351.

BALÍK, Michal - HUŠEK, Petr - HOLUB, Lukáš - KOŠINA, Josef - BROŽÁK, Miloš. Laparoskopická cystektomie - první zkušenosti. *Česká urologie*, 2015, **19**(3), 194-200. ISSN 1211-8729.

BROŽÁK, Miloš - KOŠINA, Josef - VŠETIČKA, Jaroslav - HOLUB, Lukáš - HUŠEK, Petr - PACOVSKÝ, Jaroslav. Extraperitoneální laparoskopická radikální prostatektomie. *Urologie pro praxi*, 2011, **12**(1), 50-54. ISSN 1213-1768.

BROŽÁK, Miloš - KOŠINA, Josef - HUŠEK, Petr - BALÍK, Michal - HOLUB, Lukáš - LOUDA, Miroslav - PACOVSKÝ, Jaroslav. Srovnání laparoskopické a retropubické radikální prostatektomie - zkušenosti z jednoho centra. *Česká urologie*, 2012, **16**(4), 222-229. ISSN 1211-8729.

BROŽÁK, Miloš - KOŠINA, Josef - BALÍK, Michal - HUŠEK, Petr - HOLUB, Lukáš - PACOVSKÝ, Jaroslav. První zkušenosti s novým jednostranně ostnatým stehem V-Loc při laparoskopické radikální prostatektomii. *Česká urologie*, 2012, **16**(3), 157-162. ISSN 1211-8729.

HOLUB, Lukáš - HUŠEK, Petr - KOŠINA, Josef - PACOVSKÝ, Jaroslav - BROŽÁK, Miloš. Dopady změny antimuskarinika na kvalitu života u pacientů s hyperaktivním měchýřem - výsledky studie VEST. *Česká urologie*, 2018, **22**(2), 106-114. ISSN 1211-8729.

KOŠINA, Josef - PACOVSKÝ, Jaroslav - HUŠEK, Petr - HOLUB, Lukáš - BROŽÁK, Miloš. Zkušenosti s použitím tkáňových lepidel u laparoskopických resekcí ledvin. *Urologie pro praxi*, 2015, **16**(5), 218-221. ISSN 1213-1768.

PACOVSKÝ, Jaroslav - BROŽÁK, Miloš - HUŠEK, Petr - HOLUB, Lukáš - KOŠINA, Josef - NAVRÁTIL, Pavel - LOUDA, Miroslav - PODHOLA, Miroslav. Histologický nález

nekrózy světlobuněčného karcinomu ledviny - negativní prognostický faktor. *Urologie pro praxi*, 2010, **11**(1), 32-35. ISSN 1213-1768.

- **ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise**

HUŠEK, Petr - PACOVSKÝ, Jaroslav - BUREŠ, Jiří - BROŽÁK, Miloš. Komplikace BCG intravezikální léčby – BCGitis. *Urol. Praxi*, 2019; **20**(5): 238-241.

HUŠEK, Petr - PACOVSKÝ, Jaroslav - BROŽÁK, Miloš. BCG – historie, mechanismus účinku, indikace, účinnost, dávkování. *Urol. praxi*, 2019; **20**(4): 157-160.

HUŠEK, Petr - PACOVSKÝ, Jaroslav - HOLUB, Lukáš - KOŠINA, Josef - BROŽÁK, Miloš. Arteriální hypertenze a benigní hyperplazie prostaty. *Urologie pro praxi*, 2014, **15**(5), 219-220. ISSN 1213-1768.

HUŠEK, Petr - PACOVSKÝ, Jaroslav - KOŠINA, Josef - BROŽÁK, Miloš. Léčba BHP v České republice v kontextu doporučených postupů EAU. *Urologie pro praxi*, 2012, **13**(2), 56-61. ISSN 1213-1768.

HUŠEK, Petr - BROŽÁK, Miloš - KOŠINA, Josef - HOLUB, Lukáš. Rozsáhlá lymfokéla po radikální prostatektomii. *Urologie pro praxi*, 2008, **9**(5), 249-250. ISSN 1213-1768.

HUŠEK, Petr - BROŽÁK, Miloš - PACOVSKÝ, Jaroslav. Emfyzematózní pyelonefritida - život ohrožující stav. *Urologie pro praxi*, 2010, **11**(6), 327-328. ISSN 1213-1768.

HUŠEK, Petr - KOŠINA, Josef - PACOVSKÝ, Jaroslav. Roboticky asistovaná resekce objemného angiomyolipomu levé ledviny. *Česká urologie*, 2018, **22**(4), 234-237. ISSN 1211-8729.

BROŽÁK, Miloš - KOŠINA, Josef - HOLUB, Lukáš - HUŠEK, Petr - BALÍK, Michal - PACOVSKÝ, Jaroslav. Nový extra-anatomický stent Detour, první zkušenosti s jeho zavedením. *Urologie pro praxi*, 2016, **17**(2), 91-93. ISSN 1213-1768.

BROŽÁK, Miloš - PACOVSKÝ, Jaroslav - KOŠINA, Josef - HOLUB, Lukáš - LOUDA, Miroslav - HUŠEK, Petr. Lokálně pokročilý karcinom prostaty. *Urologie pro praxi*, 2008, **9**(4), 160-164. ISSN 1213-1768.

BROŽÁK, Miloš - KOŠINA, Josef - BALÍK, Michal - HOLUB, Lukáš - PACOVSKÝ, Jaroslav - HUŠEK, Petr. Robotem asistovaná radikální prostatektomie, zkušenosti po provedení prvních 50 operací. *Urologie pro praxi*, 2017, **18**(3), 129-132. ISSN 1213-1768.

KOŠINA, Josef - BALÍK, Michal - HOLUB, Lukáš - HUŠEK, Petr - PACOVSKÝ, Jaroslav - BROŽÁK, Miloš. Extra-anatomické stenty jako alternativa nefrostomie. *Česká urologie*, 2015, **19**(3), 188-193. ISSN 1211-8729.

LOUDA, Miroslav - PACOVSKÝ, Jaroslav - NOVÁK, Ivo - GIBLO, Vladimír - HUŠEK, Petr - KUTÍLEK, Petr - HURTOVÁ, Marie - PODHOLA, Miroslav - PÁRAL, Jiří -

BRODÁK, Miloš. Histologická skladba metastáz do oblasti retroperitonea. *Urologie pro praxi*, 2012, **13**(6), 269-270. ISSN 1213-1768.

PACOVSKÝ, Jaroslav - KOŠINA, Josef - HOLUB, Lukáš - HUŠEK, Petr - BRODÁK, Miloš. Akutní selhání ledvin. *Urologie pro praxi*, 2016, **17**(2), 75-78. ISSN 1213-1768.

PACOVSKÝ, Jaroslav - NAVRÁTIL, Pavel - BRODÁK, Miloš - HOLUB, Lukáš - KOŠINA, Josef - HUŠEK, Petr. Urologické malignity u nemocných po transplantaci ledvin. *Urologické listy*, 2009, **7**(1), 49-53. ISSN 1214-2085.

PACOVSKÝ, Jaroslav - HUŠEK, Petr - KOŠINA, Josef - HOLUB, Lukáš - BRODÁK, Miloš. Traumata ledvin u rizikových pacientů. *Urologie pro praxi*, 2017, **18**(4), 158-161. ISSN 1213-1768.

BALÍK, Michal - KOŠINA, Josef - ŠPAČEK, Jiří - VACHATA, Slavomír - PACOVSKÝ, Jaroslav - HUŠEK, Petr - HOLUB, Lukáš - BRODÁK, Miloš. Laparoskopická radikální cystektomie u muže - video 2015. *Česká urologie*, 2016, **20**(2), 100-103. ISSN 1211-8729.

ŠPAČEK, Jiří - PODHOLA, Miroslav - KOŠINA, Josef - HOLUB, Lukáš - HUŠEK, Petr - BRODÁK, Miloš. Vzácný cystadenokarcinom prostaty, klinické projevy, diagnostika a léčba. *Česká urologie*, 2017, **21**(1), 73-79. ISSN 1211-8729.

BALÍK, Michal - HUŠEK, Petr - ŠPAČEK, Jiří. Roboticky asistovaná radikální cystektomie u ženy. *Česká urologie*, 2019, **23**(1), 16-18. ISSN 1211-8729.

PACOVSKÝ, Jaroslav - LOUDA, Miroslav - KOŠINA, Josef - HUŠEK, Petr - BRODÁK, Miloš. Charakteristika nemocných s tumorem ledviny s velmi krátkou Life expectancy. In: *Vybrané otázky - onkologie XIV*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010. s. 104-106. ISBN 978-80-7262-708-0.

- **odborné přednášky**

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, CHMELAŘOVÁ M, PODHOLA M. Význam epigenetických změn u urologických malignit. Výroční seminář České urologické společnosti, Olomouc, 2015.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, CHMELAŘOVÁ M, PODHOLA M. Význam epigenetických změn u urologických malignit. Výroční seminář České urologické společnosti, České Budějovice, 2016.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, CHMELAŘOVÁ M, PODHOLA M. Prediktor efektu BCG léčby u uroteliálního karcinomu měchýře, Moravské urologické sympozium, Olomouc, 2018.

HUSEK P, PACOVSKY J, CHMELAROVA M, PODHOLA M. The role of the methylation status in therapy of high grade non-muscle invasive bladder tumor. Fakulty medical postgraduate conferences, Hradec Kralove, 2017.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, GABALEC F, KOŠINA J, ČÁP J, BROŽÁK M. Oboustranná adrenalektomie – život zachraňující výkon u pacientů s Cushigovým syndromem při ektopické sekreci ACTH. Výroční seminář České urologické společnosti, Praha, 2011.

HUSEK P, PACOVSKY J, KOSINA J, BRODAK M. Laparoscopic radical prostatectomy follow trasuretral resection of prostate (TURP). Central European Meeting, Dresden (Germany), 2012.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, KOŠINA J, BROŽÁK M. Laparoskopická radikální prostatektomie u pacientů po transuretrální resekci prostaty (TURP). Výroční seminář České urologické společnosti, Ostrava, 2012.

HUSEK P, PACOVSKY J, KOSINA J, BRODAK M, HOLUB L. Follow up patients with a incidental finding infiltration of pelvis lymph nodes after radical prostatectomy. Central European Meeting, Lublana (Slovinia), 2009.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, KOŠINA J, BROŽÁK M, HOLUB L. Zhodnocení souboru pacientů s náhodným náleze N1 po radikální prostatektomii. Výroční seminář České urologické společnosti, Hradec Králové, 2009.

HUŠEK P. Karcinom prostaty a PSA (význam PSA v léčbě a diagnostice karcinomu prostaty). AESCULAB seminář, Hradec Králové 2018.

HUŠEK P, KOŠINA J. Roboticky asistované resekce ledvin – první zkušenosti. Video seminář – Tipy a triky v urologii, Hradec Králové, 2016.

HUŠEK P, KOŠINA J. Robotičky asistovaná resekce objemného angiomyolipumu ledviny. Video seminář – Tipy a triky v urologii, Hradec Králové, 2018.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, NAVRÁTIL P. Resekce nádoru transplantované ledviny. Slavnostní sympóziem k 50. výročí první transplantace ledviny v Československu, Hradec Králové, 2011.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, NAVRÁTIL P. Living-donor transplantace u nekomplikovaného pacienta po radikální cystektomii. Den pootevřených dveří transplantačního centra, Hradec Králové, 2013.

HUŠEK P, BALÍK M. END - TO - END anastomóza ureteru po iatrogenní lézi. Video seminář – Tipy a triky v urologii, Hradec Králové, 2016.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, KOŠINA J. Laparoskopická resekce centrálně uložených tumoru ledviny. Video seminář – Tipy a triky v urologii, Hradec Králové, 2017.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, KOŠINA J, BROŽÁK M. Pětileté sledování pacientů s karcinomem ledviny s ohledem na přítomnost nekrózy tumoru. Výroční konference Slovenské urologické společnosti, Košice, 2010.

HUŠEK P, PACOVSKÝ J, KOŠINA J, BROŽÁK M, LOUDA M, HOLUB L, DOMINIK J, ŽÁČEK P, HABAL P. Nefrektomie pro nádor ledviny s nádorovým trombem. Náchodské mezioborové dny, Náchod, 2013.

Opakovaná vystoupení na Regionálním semináři České urologické společnosti, Hradec Králové, 2008-2019.