

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Tomáš Urban

**Imunochemické stanovení aktivní a neaktivní formy katepsinu B
u pacientů s karcinomem močového měchýře**

**Immunochemical determination of active and inactive form of
cathepsin B in patients with bladder cancer**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce – garant: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Vedoucí diplomové práce - školitel: Doc. Ing. Karel Kotaška, Ph.D.

Praha 2015

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru IGA MZ ČR NT/11415-5.

Prohlášení

Tato diplomová práce byla vypracována ve Fakultní nemocnici Motol v laboratoři na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie. Diplomová práce byla garantována Doc. RNDr. Zuzanou Bosákovou, CSc..

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. Ing. Karla Kotašky, Ph.D., a že jsem všechny použité informační zdroje řádně citoval. Tato práce nebyla použita k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá imunochemickým stanovením koncentrací aktivní a neaktivní formy katepsinu B u pacientů s nádorem močového měchýře s cílem porovnat diagnostickou účinnost metod pro jejich možné využití k rutinní diagnostice.

Katepsin B a prokatepsin B byly měřeny v séru a v moči u 82 pacientů s karcinomem močového měchýře (47 mužů a 35 žen), s průměrným věkem 66,5 let. Kontrolní skupina byla tvořena 72 zdravými jedinci (31 mužů a 41 žen), s průměrným věkem 58,5 let. Koncentrace katepsinu B a prokatepsinu B v moči byly korigovány na kreatinin, který byl stanoven enzymatickou kreatinázovou metodou.

Koncentrace katepsinu B v moči byly u pacientů výrazně zvýšené oproti kontrolní skupině (medián = 3,5 $\mu\text{g/l}$ vs. 0,9 $\mu\text{g/l}$, $P = 0,01$), podobně byly zvýšené hodnoty poměru katepsinu B na kreatinin (medián = 0,4 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ vs. 0,1 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $P = 0,01$). Koncentrace katepsinu B v séru u pacientů nebyly významně rozdílné od kontrolní skupiny (medián = 4,8 $\mu\text{g/l}$ vs. 4,2 $\mu\text{g/l}$, $P = 0,8$).

Hodnoty koncentrací prokatepsinu B u pacientů oproti kontrolní skupině byly významně zvýšené jak v moči (medián = 3,9 $\mu\text{g/l}$ vs. 1,4 $\mu\text{g/l}$, $P < 0,0001$), tak v séru (medián = 73,3 $\mu\text{g/l}$ vs. 58,7 $\mu\text{g/l}$, $P = 0,0005$) a podobně i u poměru prokatepsinu B na kreatinin (medián = 0,6 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ vs. 0,2 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $P < 0,0001$).

Diagnosticky efektivnější byl katepsin B v moči ($AUC = 0,6$) a poměr katepsinu B na kreatinin ($AUC = 0,6$), oproti stanovení katepsinu B v séru ($AUC = 0,5$). Podobně byl prokatepsin B diagnosticky efektivnější v moči ($AUC = 0,8$) a poměr prokatepsinu B na kreatinin ($AUC = 0,8$), oproti prokatepsinu B v séru ($AUC = 0,7$).

Diagnosticky nejefektivnější se jeví stanovení prokatepsinu B v moči a poměr prokatepsinu B na kreatinin.

Klíčová slova

Katepsin B, prokatepsin B, nádor močového měchýře, ELISA

Abstract

This thesis is focused on immunochemical determination of concentration of active and inactive form of cathepsin B in patients with bladder cancer in order to compare diagnostic efficiency of methods for their possible use for routine diagnosis.

Cathepsin B and procathepsin B were measured in serum and urine in 82 patients with bladder cancer (47 men and 35 women), with the average age of 66.5 year. The control group contain of 72 healthy subjects (31 men and 41 women), with the average age of 58.5 year. The concentration of cathepsin B and procathepsin B in the urine were corrected to creatinine, which was determined by the enzymatic creatinase method.

The concentrations of cathepsin B in urine were significantly elevated in patients than in control group (median = 3.5 $\mu\text{g/l}$ vs. 0.9 $\mu\text{g/l}$, $P = 0.01$), similarly the results of the cathepsin B/creatinine ratio were elevated (median = 0.4 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ vs. 0.1 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $P = 0.01$). There were no significant difference in concentration in serum between patients and control group (median = 4.8 $\mu\text{g/l}$ vs. 4.2 $\mu\text{g/l}$, $P = 0.8$).

The concentration values of procathepsin B were significantly higher in patients compare to control group both in urine (median = 3.9 $\mu\text{g/l}$ vs. 1.4 $\mu\text{g/l}$, $P < 0.0001$), in serum (median = 73.3 $\mu\text{g/l}$ vs. 58.7 $\mu\text{g/l}$, $P = 0.0005$) and similarly in procathepsin B/creatinine ratio (median = 0.6 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ vs. 0.2 $\mu\text{g}/\text{mmol}$, $P < 0.0001$).

Cathepsin B in urine (AUC = 0.6) and the ratio of cathepsin B to creatinine (AUC = 0.6) were more diagnostical efficient, compare to determination of cathepsin B in serum (AUC = 0.5). Similarly, procathepsin B had better diagnostical efficiency in urine (AUC = 0.8) and the procathepsin B/creatinine ratio (AUC = 0.8), compare to procathepsin B in serum (AUC = 0.7).

The most diagnostical efficient seems to be the determination of procathepsin B in urine and the procathepsin B/creatinine ratio.

Key words

Cathepsin B, procathepsin B, bladder cancer, ELISA

Poděkování

Úvodem bych chtěl poděkovat svému školiteli Doc. Ing. Karlu Kotaškovi, Ph.D., a také paní Pavle Kubešové a dalším pracovníkům Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie za odborné vedení, všestrannou pomoc a cenné připomínky. Dále bych chtěl poděkovat Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za umožnění vzniku této práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také své rodině a přátelům za jejich podporu.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 9 |
| 2. Biochemická charakteristika katepsinů | 10 |
| 2.1 Struktura katepsinů..... | 13 |
| 2.2 Aktivita katepsinů a jejich regulace | 15 |
| 3 Katepsin B..... | 17 |
| 3.1 Syntéza katepsinu B | 17 |
| 3.2 Gen katepsinu B..... | 19 |
| 3.3 Regulace katepsinu B..... | 20 |
| 3.4 Katepsin B v patologických stavech | 22 |
| 4 Nádory močového měchýře | 27 |
| 4.1 Nádorové markery..... | 30 |
| 5 Metody detekce biomarkerů..... | 33 |
| 5.1 Imunochemické stanovení nádorových markerů | 34 |
| 6 Cíl práce | 37 |
| 7 Experimentální část | 38 |
| 7.1 Stanovení katepsinu B v séru a v moči | 38 |
| 7.1.1 Instrumentace, Reagencie | 38 |
| 7.1.2 Princip enzymového testu | 39 |
| 7.1.3 Analytické znaky metody..... | 40 |
| 7.1.4 Pracovní postup | 40 |
| 7.2 Stanovení prokatepsinu B v séru a v moči | 43 |
| 7.2.1 Instrumentace, Reagencie | 43 |
| 7.2.2 Princip enzymového testu | 44 |
| 7.2.3 Analytické znaky metody..... | 44 |
| 7.2.4 Pracovní postup | 45 |
| 7.3 Stanovení kreatininu..... | 48 |
| 7.4 Statistická analýza..... | 49 |
| 7.5 Charakteristika pacientů a kontrolní skupiny | 49 |
| 8 Výsledky | 50 |
| 9 Diskuze | 54 |
| 10 Závěr | 58 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|------------------|--|
| AUC | Plocha pod křivkou („Area Under Curve“) |
| Bcl-2 | B - lymfocyt |
| BID | Agonista smrti interagující s BH3 doménou |
| BLCA-4 | B - lymphocyte carcinoma cross-reacting antigen |
| BTA-Stat | Blader tumor antigen |
| Ca ²⁺ | Vápenatý iont |
| CV | Variační koeficient |
| CYFRA 21-1 | Cytokeratin fragment 21-1 |
| DNA | Deoxyrinukleová kyselina |
| EBS | Vazebné místo Ets |
| ECM | Extracelulární matrix |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| Ets | Translační faktor |
| FISH | Flourescenční hybridizace <i>in situ</i> |
| GAG | Glykosaminoglykan |
| GC | Spárované báze guanin a cytosin |
| HA | Kyselina hyaluronová |
| HPV | Lidský Papillomavirus |
| H-RAS | Rat sarcoma |
| hTERT | Human reverse transcriptase |
| LC-MS/MS | Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií |
| M6P | Manosa-6-fosfát |
| MMP | Matrixová metaloproteinasa |
| mRNA | Mediátorová ribonukleová kyselina |
| NAD | Nikotinamidadenindinukleotid |
| NMP-22 | Nuclear matrix protein 22 |
| P - hodnota | Hodnota testu statistické hypotézy |
| pDel | Delece na p ramenu chromozomu |
| pH | Záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů |
| PI3K | PI3 kinasa |
| PIK3CA | Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kinase, katalytická subjednotka alpha |
| prouPA | Prourikinasový aktivátor plasminogenu |

| | |
|----------------|---|
| pT1 | Označení pro histologický nález postihující subepiteliální vazivo |
| pT2 | Označení pro histologický nález postihující svalovinu |
| pTa | Označení pro histologický nález neinvazivního papilárního karcinomu |
| PTEa | Fosfátový homolog |
| pTis | Označení pro histologický nález karcinomu <i>in situ</i> |
| qDel | Delece na q ramenu chromozomu |
| RB | Retinoblastom |
| rER | Drsné endoplasmatické retikulum |
| ROC | Receiver operating characteristic |
| RT-PCR | Reverzní transkriptázová-polymerázová řetězová reakce |
| SELDI | Povrchem zvýšená laserová desorpce/ionizace |
| Sp1 | transkripční faktor |
| TGF- β 1 | Transformující růstový faktor β |
| TGFR3 | Fibroblastový růstový faktor receptoru 3 |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumorový nekrotizující faktor |
| TP53 | Tumorový protein 53 |
| tPa | Tkáňový aktivátor plasminogenu |
| TRAP test | Telomeric repeat amplification protocol assay |
| UBC | Nádor močového měchýře |
| uPa | Urokinasový aktivátor plasminogenu |
| UTR | Netranslační region |

1. Úvod

Nádorová onemocnění patří mezi nejrozšířenější civilizační choroby, které ve většině případů končí úmrtím až několika milionů lidí ročně na celém světě¹. V České republice každý třetí člověk onemocní během svého života rakovinou a každý čtvrtý jí podlehne². Předpokládá se, že v následujících dvou desetiletích vzroste počet případů o 70 %. Třetinu všech nádorů zapříčiňuje následujících pět aktivit: obezita, nízká konzumace ovoce a zeleniny, nedostatek pohybové aktivity a užívání tabákových či alkoholických výrobků¹.

Nádory močového měchýře patří celosvětově mezi jedenácté nejrozšířenější nádorové onemocnění, s nejvyšším výskytem v Evropě, Severní Americe a státech Východní Asie. Naopak nejlépe jsou na tom země Střední a Jižní Afriky, Oceánie a Střední Ameriky. Celosvětová úmrtnost se pohybuje přes 150 000 lidí za rok a je objeveno přes 380 000 nových případů ročně. Úmrtnost je třikrát vyšší u mužů než u žen. Hlavní příčinou vzniku nádorů je užívání tabákových výrobků, což má v Evropě za následek až 50 % vzniklých případů³.

V současnosti se pro diagnostiku nádorových onemocnění využívají invazivní metody. Tyto metody jsou však pro pacienty zatěžující, a proto se v moderní medicíně snaží prosadit neinvazivní metody založené na analýze specifických biomarkerů. Mezi výhody biomarkerů patří například včasná detekce nádorů během krátkého časového období. Dále jsou vhodné například pro sledování pacientů, bez fyzické či psychické zátěže. Tato diplomová práce se zabývá porovnáním dvou analytických metod na stanovení aktivní a neaktivní formy katepsinu B jako potenciálních nádorových markerů močového měchýře⁴.

2. Biochemická charakteristika katepsinů

Objev katepsinů sahá do první poloviny 20. století, kdy Gutman a Fruton poprvé identifikovali katepsin C. Následně byly identifikovány další hlavní třídy katepsinů a byly publikovány sekvence jejich aminokyselin. Až do 90. let nebyly známy žádné souvislosti katepsinů a jejich fyziologické či patologické role v živých organismech. V roce 1990 byla poprvé určena krystalická struktura katepsinu B a její objev vedl ke zvýšenému zájmu o studium lysosomálních proteas^{5,6}.

Katepsiny patří do skupiny proteas, konkrétně do rodiny papainových enzymů. Jejich název byl odvozen z řeckého slova „kathépsin“, neboli „k trávení“. Proteasy se většinou nacházejí v lysosomech, které jsou buňkou využívány při degradaci extracelulárních sloučenin, které byly buňkou přijaté formou endocytózy či intracelulárně autofagií. Z této skupiny je známo 11 lidských cysteinových katepsinů a jsou označovány písmenem – katepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W a X⁷. Katepsiny jsou nejdříve syntetizovány ve formě neaktivních proteinů (zymogenů), které se po následující kaskádě reakcí aktivují v kyselém prostředí lysosomů⁸. Charakteristické znaky katepsinů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. – Specifikace katepsinů^{9,10}.

| Název | Výskyt | Onemocnění | pH Optimální | pH Stabilní |
|------------|--|---|-----------------|----------------|
| Katepsin B | Přítomný ve všech tkáních a orgánech | Nádory, revmatoidní artritida, pankreatitida | 4 – 6 | 7 |
| Katepsin C | Přítomný ve všech tkáních a orgánech | Papillonův-Lefevrův syndrom, Haim-Munkův syndrom | 6 | 4 – 7,5 |
| Katepsin F | Srdce, svalovina, mozek, varlata, vejcovody | Nádory, neuronální lipofuscinóza | 5,2 – 6,8 | 4,5 – 7,2 |
| Katepsin H | Mozek, ledviny, játra, zanícené krční mandle | Nádory, ateroskleróza | 6,8 | 5 – 8 |
| Katepsin K | Především kosti (osteoklasty), většina epitelových tkání | Osteoporóza, revmatoidní artritida, osteoartróza | 6 | 4 – 8 |
| Katepsin L | Přítomný ve všech tkáních a orgánech | Nádory, ateroskleróza, obezita, epidermální hyperplazie, kardiopatie, zánětlivá onemocnění | 6 | 4 - 7 |
| Katepsin O | Široce rozšířený | Nádory | - | - |
| Katepsin S | Makrofágy v alveolách, slezina, varlata, epitelové buňky | Bronchiální astma, artritida, ateroskleróza, lupénka, rakovina, neurodegenerativní onemocnění | 6 | 4,5 - 8 |
| Katepsin V | Především brzlík, varlata, také mozek, kůže | Autoimunitní onemocnění, myasthenia gravis | 5,7 | 4 – 7,2 |
| Katepsin W | Slezina, T-buňky (fyziologické i cytotoxické) | - | - | - |
| Katepsin X | Široce rozšířený, především nádory | Nádory, zánětlivá onemocnění | 5 – 5,5 | - |

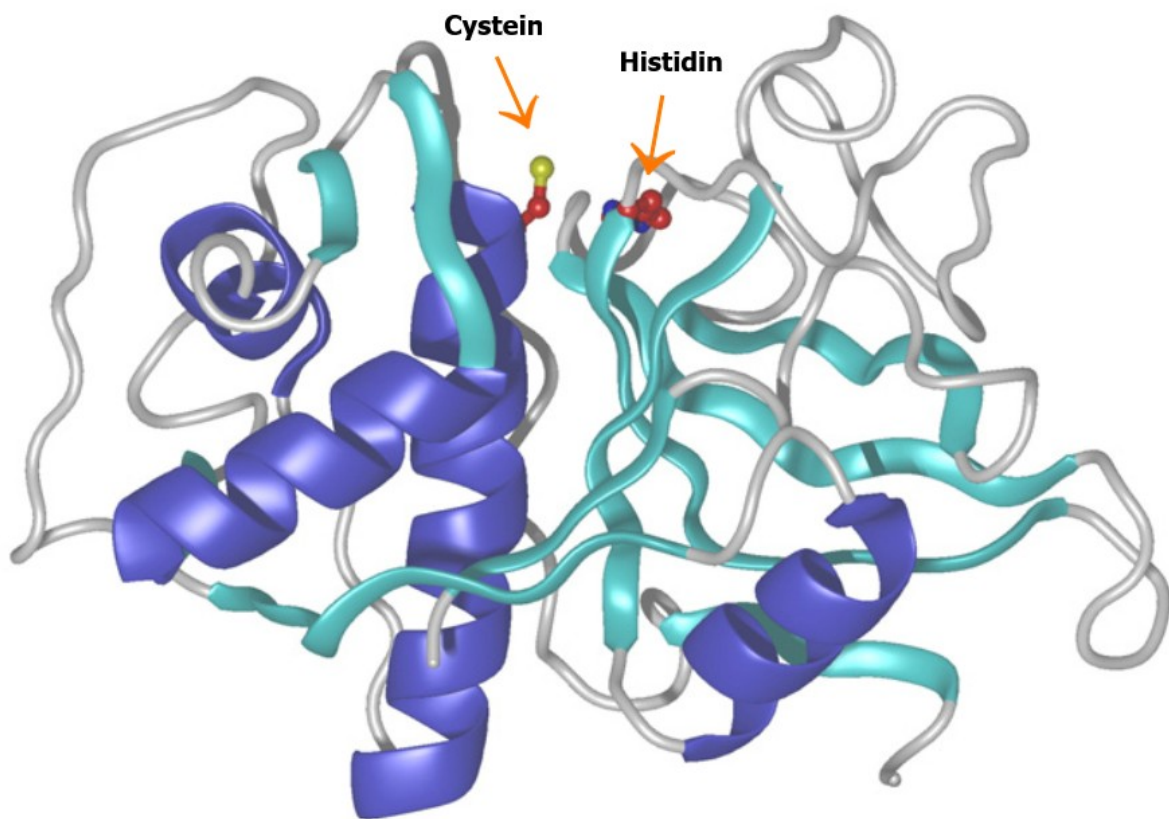
Význam katepsinů byl zprvu podceněn, protože se považovaly za enzymy působící nespecificky pouze v kyselém prostředí lysosomu. Katepsiny ale plní funkce i v extracelulárních prostorech či v jadérku^{8,9}. Přehled aktivit, míst působení a funkcí katepsinů je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. – Katepsiny – přehled aktivity, míst působení a funkcí⁹.

| Název | Aktivita | Místo působení | Funkce |
|--------------|---|--|---|
| Katepsin B | Endopeptidasová, dipeptidasová | Lysosomální, extracelulární | Proteolytické reakce u nádorových invazí a metastází |
| Katepsin C | Endopeptidasová, dipeptidasová, tripeptidyl-peptidasová | Lysosomální | Aktivace granulocytů a faktoru XIII neuraminidas |
| Katepsin F | Endopeptidasová | Lysosomální | Důležitost u nádorových invazí a metastází |
| Katepsin H | Endopeptidasová, aminopeptidasová | Lysosomální | Nemněná řetězová degradace (Ii degradace) |
| Katepsin K | Endopeptidasová | Lysosomální, extracelulární | Resorpce kostí, rozklad extracelulárních matrix a fibrinogenu |
| Katepsin L | Endopeptidasová | Lysosomální, extracelulární, jadérková | Antigenní, Ii degradace, regulace buněčného cyklu |
| Katepsin O | Endopeptidasová | Lysosomální | Proteinová regulace |
| Katepsin S | Endopeptidasová | Lysosomální, extracelulární | Ii degradace, antigenní činnost, angiogeneze |
| Katepsin V | Endopeptidasová | Lysosomální | Ii degradace, antigenní činnost |
| Katepsin W | Neurčena | Lysosomální | Imunitní funkce, regulace cytotoxicity T-buněk |
| Katepsin X | Karboxy-monopeptidasová, Karboxy-dipeptidasová | Lysosomální | Neproteolytická |

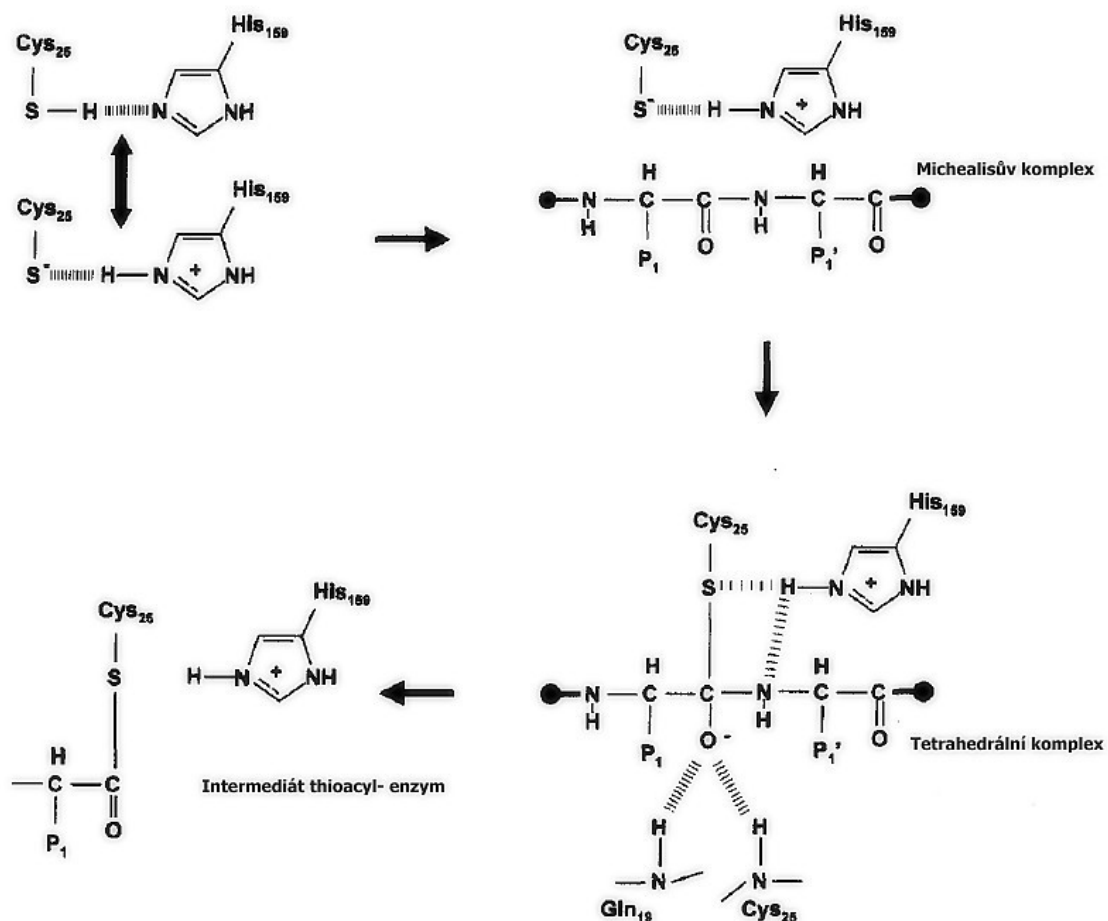
2.1 Struktura katepsinů

Katepsiny se skládají ze dvou domén. První, formované z 3 α -helixů, znázorněné jako modré spirály, a z druhé domény, tvořené β -barelní strukturou, znázorněné modrozelenými pruhy (viz obrázek 1). Tyto dvě domény tvoří v prostoru mezi sebou aktivní místo, kde jsou umístěny aktivní aminokyselinové zbytky cysteinu a histidinu znázorněné atomy síry (žlutozeleně) a dusíku (červeně)¹¹. Proregion na *N*-konci katepsinu se sbaluje do útvaru vlásenky (angl. „hairpin“) tvořené třemi α -helixy a spojené smyčkou ke katepsinu. Tato vlásenka tvoří kotvu, která pomáhá navázání polypeptidového řetězce do aktivního místa¹².



Obrázek 1 – Struktura katepsinu, s aktivním místem obsahujícím cystein a histidin⁸.

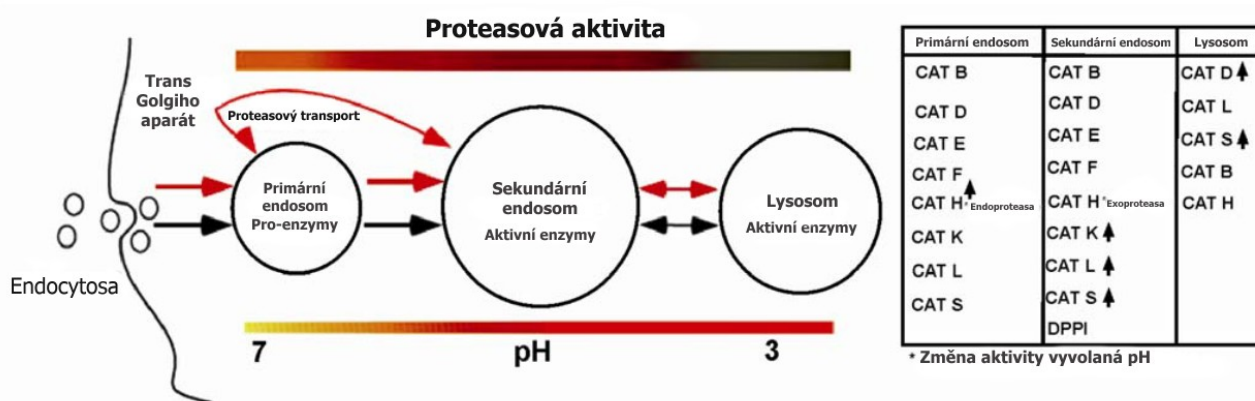
Enzymatická reakce katepsinů je zobrazena na obrázku 2. Principem reakce je vznik tetrahedrálního komplexu jako produktu rozpadu peptidové vazby po reakci s –SH skupinou cysteinu.



Obrázek 2 – Schéma zobrazující enzymatickou reakci cysteinových proteas¹³.

2.2 Aktivita katepsinů a jejich regulace

Proteolytická aktivita katepsinů významně závisí na pH. Při poklesu hodnot pH během maturace endosomů, se oslabuje interakce mezi propeptidem a proenzymem, čímž se usnadňuje aktivace (viz obrázek 3). Katepsiny takto zaujímají dvě konformace, otevřenou a uzavřenou, a tím je zpřístupňováno aktivní místo. Propeptid blokuje aktivní místo při neutrálním či mírně kyselém pH a naopak toto místo zpřístupňuje při $\text{pH} < 5^{5,8}$. Pokud pH poklesne na hodnotu 3,8, jsou katepsiny B, S a L v lysosomech ireverzibilně denaturovány až do jejich konečného stádia maturace. Katepsiny F, H, K, L a V jsou nestabilní za neutrálního pH, a proto méně aktivní mimo lysosomy. Na rozdíl od těchto katepsinů jsou katepsiny B a S vysoce stabilní. Předpokládá se, že katepsiny B a S jsou aktivní i v extracelulární matrix^{5,14}.



Obrázek 3 – Distribuce a funkce katepsinů u endocytosy⁵.

Důležitým regulátorem katepsinů jsou makromolekulární inhibitory, které se váží na aktivní místo, a tím zabraňují vazbu se substrátem. Mezi nejvýznamnější regulátory katepsinů patří glykosaminoglykany (z angl. „Glycosaminoglycans“ GAGs), které patří do skupiny heteropolysacharidů. Skládají se z disacharidových jednotek a silně negativně nabitých částic karboxylových a sulfátových skupin. Většina GAGs obsahují sulfátové skupiny, mezi tyto GAGs patří chondroitinsulfát, keratansulfát, heparansulfát a heparin. Výjimku tvoří hyaluronová kyselina, která jako jediná neobsahuje sulfátové skupiny⁸.

Katepsiny jsou společně s dalšími lysosomálními enzymy v neaktivních lysosomech inhibovány intralysosomálními GAGs sloučeninami. Získaná data z vědeckých studií ukazují zajímavou souvislost mezi katepsiny a GAGs. Katepsiny štěpí proteoglykany hojně v ECM, a tím se uvolňují do ECM společně s GAGs, následně GAGs ovlivňují jejich aktivitu i stabilitu v ECM^{8,11}.

Mezi další regulátory patří cystatinové inhibitory, především stefiny, cystatiny, kininogeny, tyropiny a serpiny. Tyto inhibitory se rozdělují na pohotovostní a regulační inhibitory. Mezi pohotovostní inhibitory patří cystatiny, které primárně inhibují proteasy v patogenech. Regulační inhibitory kromě inhibice, modulují i proteasovou aktivitu. Nacházejí se poblíž cílených proteas. Oba typy inhibitorů jsou důležité v udržování fyziologie buněk⁷.

Mezi buněčné regulační mechanismy jsou řazeny také cytoplazmatické membránové receptory, které interagují jak s prokatepsiny, tak s katepsiny. Tyto receptory regulují hladinu extracelulárních proteas za fyziologických, tak i patologických podmínek. Při selhání tohoto mechanismu je aktivita katepsinů stabilizována katepsinovými inhibitory, které jsou přítomné v extracelulární tekutině⁹. Extracelulární výskyt katepsinů je spojován s výskytem nádorových onemocnění, a také artritidy, což je doprovázeno štěpením extracelulárních molekul kolagenu a fibronektinu⁸.

Dalším pospaným regulačním mechanismem je alternativní sestřih exonů vedoucích ke ztrátě signálního proregionu¹⁵.

U některých buněk aktivní katepsiny opouští lysosomy a jsou transportovány k plasmatické membráně a secernovány do extracelulárního prostoru prostřednictvím Ca^{2+} transportní fúze a v tomto extracelulárním prostoru dochází k sestřihu^{9,16}. Takto modifikované katepsiny byly pozorovány v matrix mitochondrií a v jádérkách buněk¹⁶. Zkrácené formy katepsinů v matrix mitochondrií a v jádérku se podílí na regulaci buněčného cyklu, iniciaci apoptózy, ale mohou být příčinou i degenerativních onemocnění. Při patologických stavech buňky, dochází k uvolňování katepsinů z lysosomu do cytosolu a předpokládá se, že je tím iniciována apoptóza buňky. U katepsinů se ukázalo, že transport u fibroblastů adenokarcinomu prsu může probíhat nezávisle na mannosu-6-fosfátu, což svědčí o alternativním mechanismu transportu⁹.

3 Katepsin B

Katepsin B je glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti 25 000 – 28 000^{4,17,18}. Prekurzor lidského katepsinu B se skládá z 339 aminokyselin, po následné aktivaci se vyskytuje jako jednořetězcový protein s 254 aminokyselinami či v dvouřetězcové formě skládající se ze 47 a 205 aminokyselin¹⁹. Je to thiol-dependentní proteasa patřící do rodiny papain cysteinových proteas. Katepsin B zastává především funkce degradace extracelulární matrix, metabolismus proteinů a udržování normálního metabolismu buněk⁴.

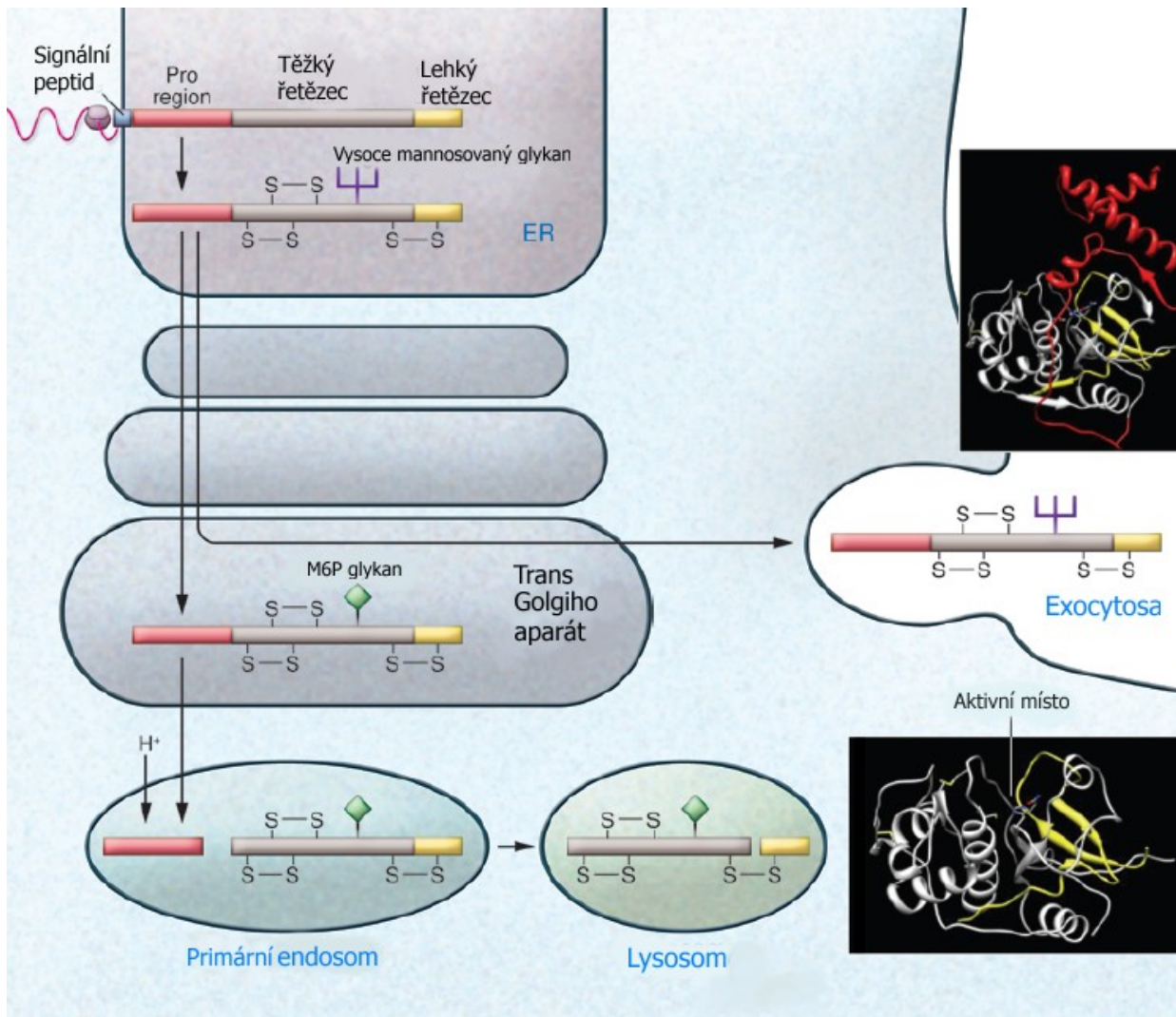
Katepsin B se podílí na řadě fyziologických procesů v organismu. Jsou popisovány jeho antiamyloidní a neuroprotektivní vlastnosti²⁰. Nalezen byl u amyloidních plaků v mozku a u Alzheimerovy choroby. Zde se pravděpodobně účastní produkce bílkovinných agregátů amyloid beta^{20–22}. Jiné studie dokazují, že proteolytického štěpení katepsin B snižuje produkci amyloidů beta^{23,24}. Katepsin B se podílí na udržování buněčné homeostázy, kterou ovlivňuje proteolytickými reakcemi. Je zapojen v regulaci hladiny huntingtinu u makroautofágů, a tím zabraňuje vzniku neuro-degenerativních onemocnění^{20,25}.

Za fyziologických podmínek se katepsin B účastní důležitých procesů v udržování fyziologických funkcí a rozkladu toxických či organismu nepotřebných látek. S těmito vlastnostmi plní katepsin B důležitou funkci jako součást imunitního systému a napomáhá při hojení poškozených tkání²⁰. Je také zmiňován význam katepsinu B v metabolismu proteinů a dalších regulačních procesů, buněčné signalizace, imunitní funkci, modifikaci kostní tkáně a také se podílí na patologických procesech, zahrnujících metastázy²⁶.

3.1 Syntéza katepsinu B

Katepsin B je nejdříve syntetizován ve formě neaktivního preproenzymu o molekulové hmotnosti 39 000 – 47 000²⁷ v drsném endoplasmatickém retikulu (z angl. „rough Endoplasmatic Reticulum“ rER). Tento preproenzym se skládá z jednoduchých řetězců aminokyselin a multifunkčního *N*-konce proregionu a signálního peptidu. Signální peptid transportuje molekulu do rER k další úpravě. Preproenzym je po transportu do rER hydrolyzován, je odštěpen signální peptid, a za přítomnosti proregionu je protein složen. Takto vzniklý prokatepsin B zůstává v neaktivní formě díky proregionu z *N*-konce, který uchovává tuto strukturu za neutrálního pH^{5,16,28}. U prokatepsinu B vznikají disulfidické vazby a je glykosylován za přítomnosti glykosamidas a mannosových glykanů o vysoké koncentraci. Připojené mannosy jsou modifikovány v Golgiho aparátu na mannosu-6-fosfát (z angl.

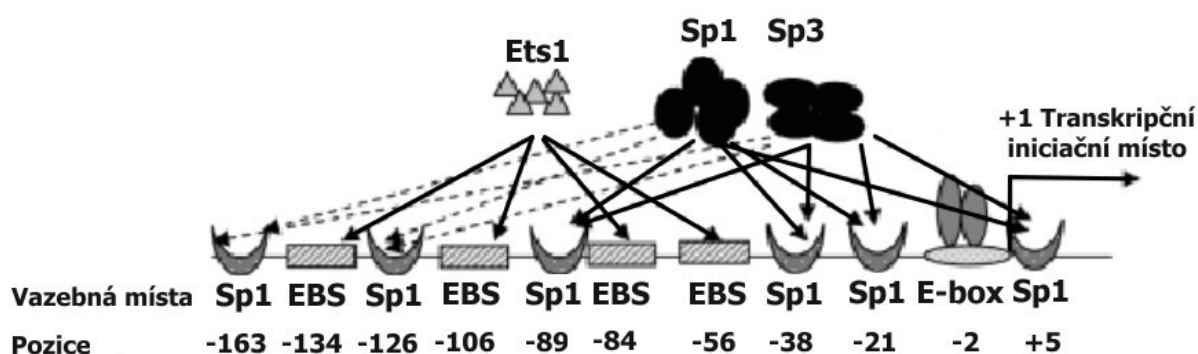
„mannose-6-phosphate“ M6P). Slouží jako signální molekuly pro transport katepsinu B do endosomálních a lysosomálních vezikul za pomoci klatrinů. V kyselém prostředí endosomů se katepsin aktivuje, čímž dojde k odštěpení proregionu a katepsin se stane aktivním. Dále se štěpí v lysosomech na lehký a těžký řetězec (viz obrázek 4)^{16,28}.



Obrázek 4 – Posttranslační modifikace katepsinu B. Na obrázku jsou zobrazeny dva možné způsoby sekrece katepsinu B. Většina katepsinů B je glykosylována v Golgiho aparátu a následně secernována do primárního endosomu, kde je odštěpen proregion, čímž se katepsiny stávají aktivní. Část katepsinů B není glykosylována a je excitována do extracelulárního prostoru, v neaktivní formě¹⁶.

3.2 Gen katepsinu B

Studie molekulární regulace katepsinu B začaly izolací lidské komplementární DNA katepsinu B z nádorových a fetálních jaterních buněk. Gen katepsinu B je lokalizován na chromozomu 8p22. Tento gen se skládá z více jak 27 000 bází v lidském genomu. Lidský katepsin B je tvořen celkem 12 exony, přičemž exony 1, 2 a část exonu 3 jsou nekódující a vytváří 5'-netranslační region (5'-UTR, z angl. „untranslated region“) a většina exonu 11 a exon 12 formuje region 3'-UTR. Byla studována transkripční regulace katepsinu B u gliomů, pomocí izolovaného 22 000 bází dlouhého regionu promotoru katepsinu B a exonu 1. Tento region je bohatý na GC páry (80 %), skládá se ze 4 vazebných míst Ets (z angl. „Ets bounding site“ EBS), 6 vazebných míst Sp1 a 1 E-boxu (viz obrázek 5). Element E-box souvisí s počátečním místem transkripce a je nepostradatelný pro aktivitu promotoru katepsinu B u lidských myotubulů a myoblastů, ale i nádorových gliomů¹⁵.



Obrázek 5 – Schématické znázornění regulačních prvků v promotoru katepsinu B a transkripčních faktorů, které se váží na tyto prvky. Potvrzené transkripční faktory s vazebným místem jsou znázorněny plnou čarou. Potenciální neprostudované interakce jsou znázorněny přerušovanou čarou¹⁵.

Lokus lidského genu katepsinu B (8p22), je region s častým výskytem delecí alel u řady nádorových onemocnění. I přes tyto delece však není funkce katepsinu B nijak alterována. Naopak bylo zjištěno, že u adenokarcinomu jícnu probíhá amplifikace genu katepsinu B. U nádorových buněk byla prokázána existence dalšího exonu, nacházející se mezi exony 2 a 3 (exon 2a/2b)^{15,29}. Byla pozorována nadměrná produkce mRNA katepsinu B, u amplifikovaného katepsinu B u všech případů a u neamplifikovaného katepsinu B v 30 % případů. Lze předpokládat, že katepsin B je možné regulovat na transkripční úrovni¹⁵.

Zvýšené hodnoty katepsinu B byly nalezeny u nádorových buněk tlustého střeva, prostaty a gliomů. Z nedávných studií je patrné, že při interakci kolagenu I s endoteliálními buňkami dochází ke zvýšené produkci transkripčního faktoru Ets1, který následně transaktivuje gen MMP-1¹⁵.

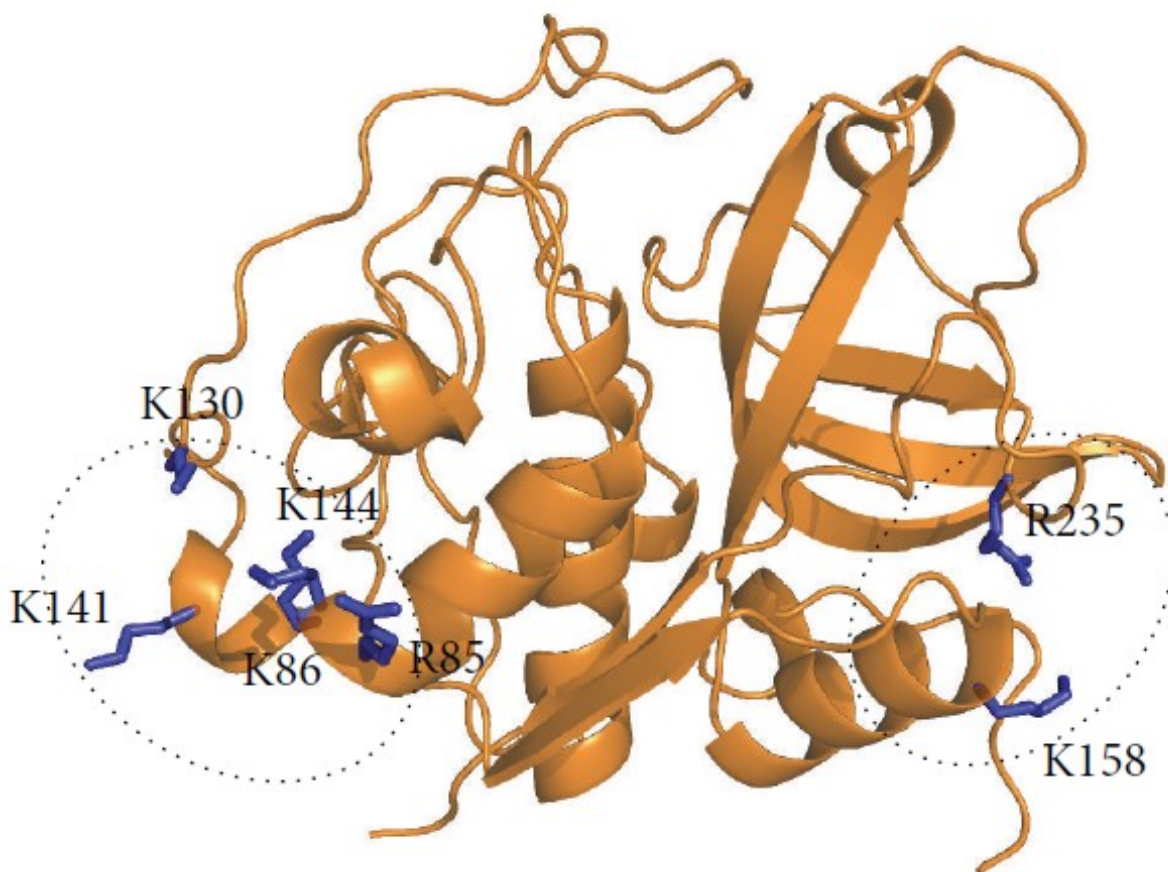
Variace transkriptů katepsinu B, jsou způsobeny odlišnostmi v alternativních sestřizích, zvláště u 5'-UTR a 3'-UTR. U 5'-konce dochází nejméně k sedmi transkriptům, z nichž pět je kódující pro „wild type“ preprokatepsin B. Další dva transkripty jsou vytvořeny vystřížením exonu 3 z primárního transkriptu nebo použitím převrácené formy exonu 4 jako promotoru. V tabulce 3 je popsán soubor chybějících exonů a jejich působnost v oblasti nádorů. Vystřížené exony mohou kódovat zkrácený protein katepsinu B, který postrádá 17 aminokyselin u signálního peptidu a 34 aminokyselin u propeptidu. Překvapivě zkrácený katepsin B bez signálního peptidu nebyl nalezen v cytoplasmě, ale byl lokalizován v jádru a dalších organelách buňky¹⁵.

Tabulka 3 – Varianty sestřihů transkriptů katepsinu B a jejich výskyt u nádorů¹⁵.

| Vystřížený exon | Výskyt u nádorů |
|------------------------|--------------------------------------|
| Exon 2 | Mozek, prsa, tlusté střevo, prostata |
| Exon 2a/2b | Žaludek, prostata |
| Exon 2 a 3 | Prsa, tlusté střevo, kůže |
| Exon 1 a 2 | Mozek |
| Exon 1, 2 a 3 | Mozek |
| Exon 10 (inzerce) | Žaludek |
| Exon 12 | Tlusté střevo |

3.3 Regulace katepsinu B

Ze studie vzájemného působení katepsinu B a GAGs se ukázalo, že vazba heparinu nebo heparansulfátu, zvyšuje stabilitu katepsinu B, který je jinak v alkalickém prostředí při pH = 8 nestabilní. Na druhou stranu tato interakce mírně snižuje aktivitu katepsinu B. Za těchto podmínek byla provedena počítačová simulace, která předpověděla dvě teoretická vazebná místa pro GAGs sloučeniny, každé na jedné straně enzymu. Tyto místa jsou vyznačena modrými regiony na obrázku 6⁸.



Obrázek 6 – Katespin B s vyznačenými vazebnými místy pro GAGs⁸.

Předpokládá se, že tyto negativně nabitě molekuly GAGs by mohly hrát roli při extracelulární aktivaci katespinu B při nádorových onemocněních. U GAGs sloučenin byl pozorován příznivý vliv na „otevřenou“ konformaci katespinu B. Negativně nabitý povrch GAGs totiž zvyšuje rychlost aktivace katespinu B ze zymogenů, což může hrát důležitou roli při extracelulární aktivaci katespinu B, a to nejen za kyselého pH, ale i při hodnotách blízkých se neutrálnímu pH⁸.

Zprvu se předpokládalo, že autokatalytická aktivace zymogenů je unimolekulární proces, ale následně se zjistilo, že tato aktivace je kombinací jak unimolekulárního, tak bimolekulárního procesu. Prokatespin B vykazuje malou katalytickou aktivitu, která však je dostatečná pro spuštění autokatalytické aktivace zymogenu. Aktivace zymogenu probíhá ve dvou krocích. V první fázi se disociuje propeptid z aktivního místa, což je unimolekulární reakce. V dalším kroku probíhá bimolekulární proces, kdy takto aktivovaná molekula zymogenu aktivuje další prokatespin B. Takto vzniklé aktivní katespiny odstartují řetězovou reakci vedoucí k rychlé aktivaci zbývajících molekul prokatespinu B⁷.

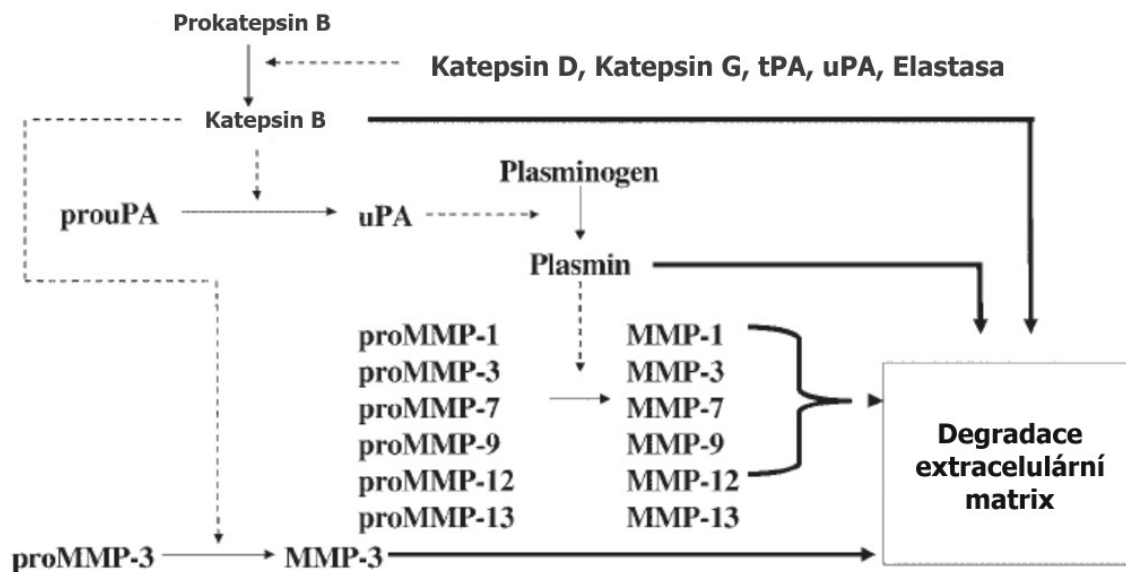
K urychlení autokatalýzy dochází v přítomnosti negativně nabitých částic, jako jsou GAGs a dextranové sulfáty. Urychluje se jak samotný proces, tak i odštěpení propeptidu vedoucí k aktivaci katepsinu B⁷.

3.4 Katepsin B v patologických stavech

O katepsinu B se poprvé začalo mluvit v souvislosti s nádorovými onemocněními v 80. letech. V nynější době je už prokázána jeho důležitá role u nádorových onemocnění, což je podloženo klinickými články a výsledky z experimentů na laboratorních myších s nádory³⁰⁻³². Katepsiny B začaly být objevovány i v kompartmentech, jako jsou jádro či mitochondrie. Jsou secernovány do extracelulárního prostoru, kde zastávají různé specifické fyziologické úkony, například degradace extracelulární matrix (z angl. „Extracellular matrix“ ECM). Tyto procesy jsou za normálních podmínek striktně regulovány. Chybná regulace katepsinů je spojována s projevy patologických onemocnění. Také bylo zjištěno, že katepsin B se podílí na formování, růstu a invazi nádorových buněk^{7,32}.

Nádorové buňky vytváří během svého růstu své mikroprostředí, které je charakteristické nízkým pH, jako je tomu u lysosomů, a tím se toto prostředí stává vhodným také pro katepsiny B³³.

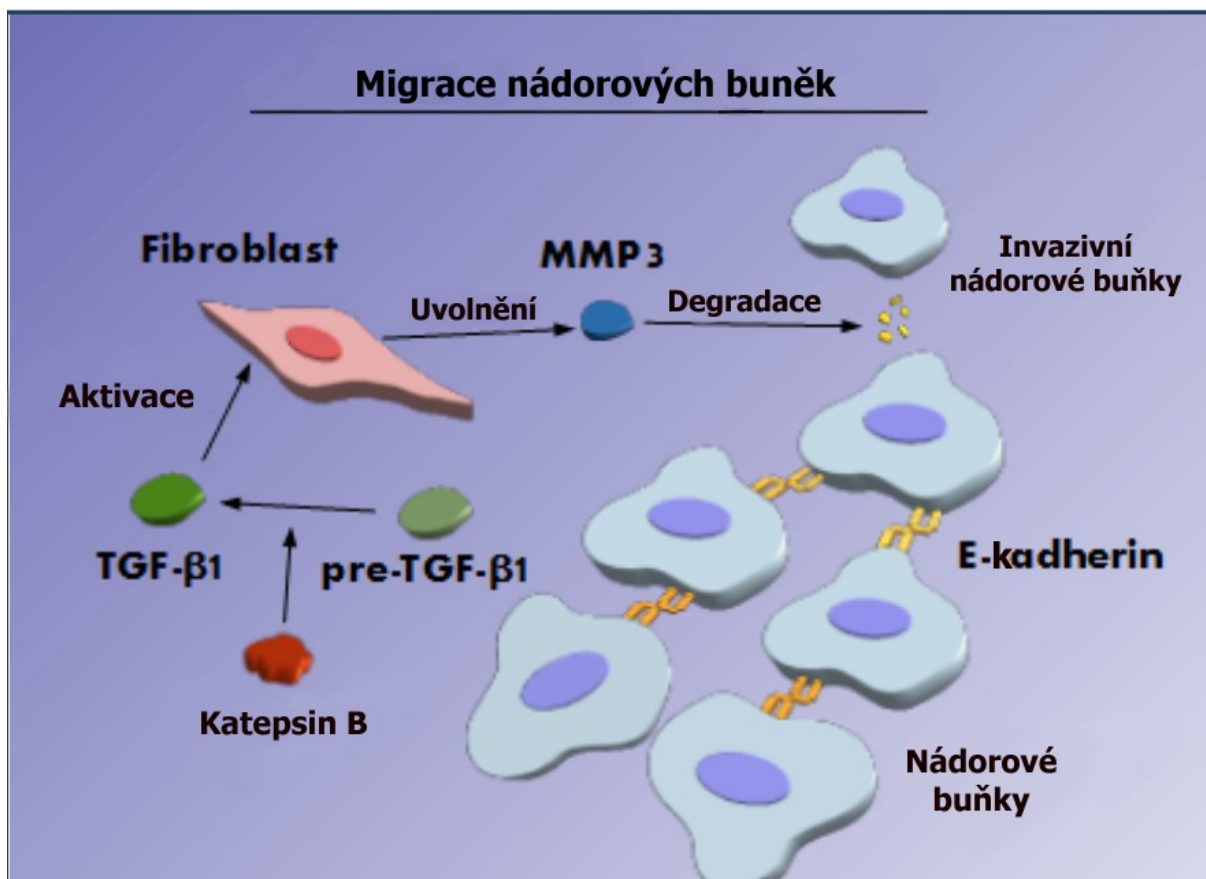
Katepsin B je znám svou interakcí s cystatiny a annexiny II, což vede k aktivaci složek ECM a možné degradaci ECM. Katepsin B podporuje zhoubné nádory také tím, že aktivuje další proteasy, díky tomu, že potlačuje jejich inhibici²⁰. Například zvyšování koncentrace katepsinů B má za následek degradaci matrixových metaloproteinasových inhibitorů (z angl. „Matrix Metalloproteinase“ MMP)³⁴, které striktně regulují specifický projev buněk a vyskytují se právě u buněk se zánětem³⁵. Mezi tyto oblasti patří virální infekce, srdeční onemocnění, osteoartritida, osteoporóza a mnohé další nemoci spojené s imunitním systémem³⁴. Mnoho studií ukázalo, že katepsin B se podílí na počáteční aktivaci kaskády, zahrnující aktivaci prourokinasového aktivátoru plasminogenu (z angl. „prourokinase Plasminogen Activator“ prouPA) na urokinasový aktivátor plasminogenu (uPA). Plasminogen je následně aktivován na plasmin pomocí uPA, což vede k degradaci ECM (viz obrázek 7)^{20,36,37}.



Obrázek 7 – Aktivace proteas katepsinem B vedoucí k degradaci ECM. Zkratky: MMP – Matrixové metaloproteinasy, tPA – tkáňový aktivátor plasminogenu, uPA – urokinasový aktivátor plasminogenu¹⁵.

Potvrdilo se, že na zvýšení exprese katepsinu B se podílí také několik významných substrátů (kalcitriol, butarát sodný, trans-retinová kyselina)²⁰.

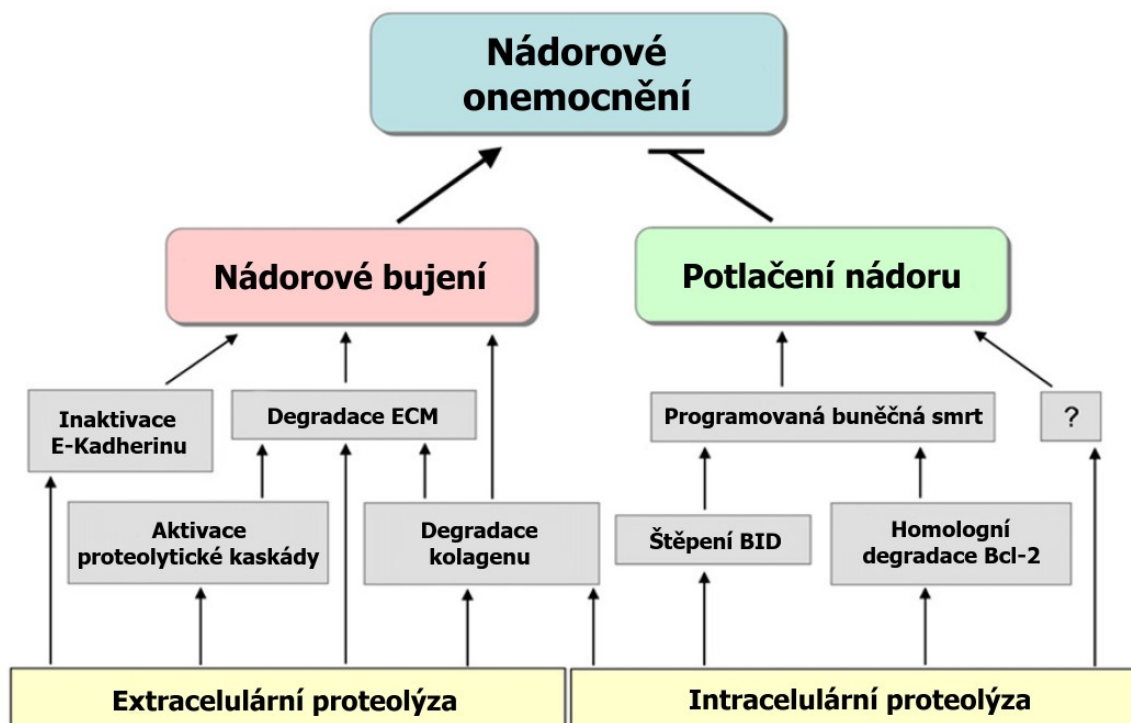
Invaze nádorových buněk může být způsobena štěpením E-kadherinových spojů mezi buňkami (viz obrázek 8). E-kadherin, může být štěpen přímo či nepřímo katepsinem B. Katepsin B působí nepřímo na E-kadherin aktivací faktoru TGF- β 1, který prostřednictvím aktivace fibroblastu uvolní MMP-3, který následně rozštěpí vazby E-kadherinu a dojde k migraci nádorových buněk³³.



Obrázek 8 – Migrace nádorových buněk, štěpením E-kadherinu. Zkratky: TGF-β1 – Transformující růstový faktor β, MMP3 – Matrixová metaloproteinasa 3³³.

Zvýšené hodnoty katepsinů B mohou být zapříčiněny několika mechanismy. Například amplifikací katepsinu B, kdy dochází k jeho nadměrné expresi. Transkript katepsinu B, který postrádá exon 2, má vyšší účinnost transkripce, čímž může dojít k nadměrné expresi katepsinu B v nádorech prsu, tlustého střeva, prostaty. U varianty transkriptu bez exonu 2 a 3 je katepsin B nasměrován do mitochondrií a spustí se tím apoptóza buňky³². U buněk fibrosarkomu a tumorového nekrotizujícího faktoru (z angl. „Tumor Necrosis Factor“ TNF) byla pozorována zvýšená aktivita katepsinu B a následná smrt buňky apoptózou³⁸. Tento proces probíhá u intracelulárního štěpení, kdy katepsin B štěpí proti-apoptický faktor Bcl-2 a zároveň je proteolyticky aktivován proapoptický faktor Bid. Následně nastává cílená smrt buňky a šíření nádoru je zastaveno⁷. Podobné účinky na apoptózu buněk, jako mají kaspasy, byly pozorovány i u katepsinu B. Katepsin B může být dostatečným signálem pro apoptózu bez potřeby kaspas, ale tento mechanismus není zatím objasněn. Katepsin B hraje tedy dvojí roli v nádorové invazi, jednak snižuje malignitu pro-apoptickými rysy, na druhé straně však podporuje nádorovou invazi buněk³⁸.

Metabolické děje ovlivněné katepsiny při nádorových onemocněních jsou shrnuty na obrázku 9⁷.



Obrázek 9 – Mechanismus zapojení cysteinových katepsinů v průběhu nádorových onemocnění. Zkratky: ECM – Extracelulární matrix, Bcl2 – B-lymfocyty 2, BID – „Agonista smrti interagující s BH-3 doménou“ (z angl. „BH-3 homology interacting-domain death agonist“)⁷.

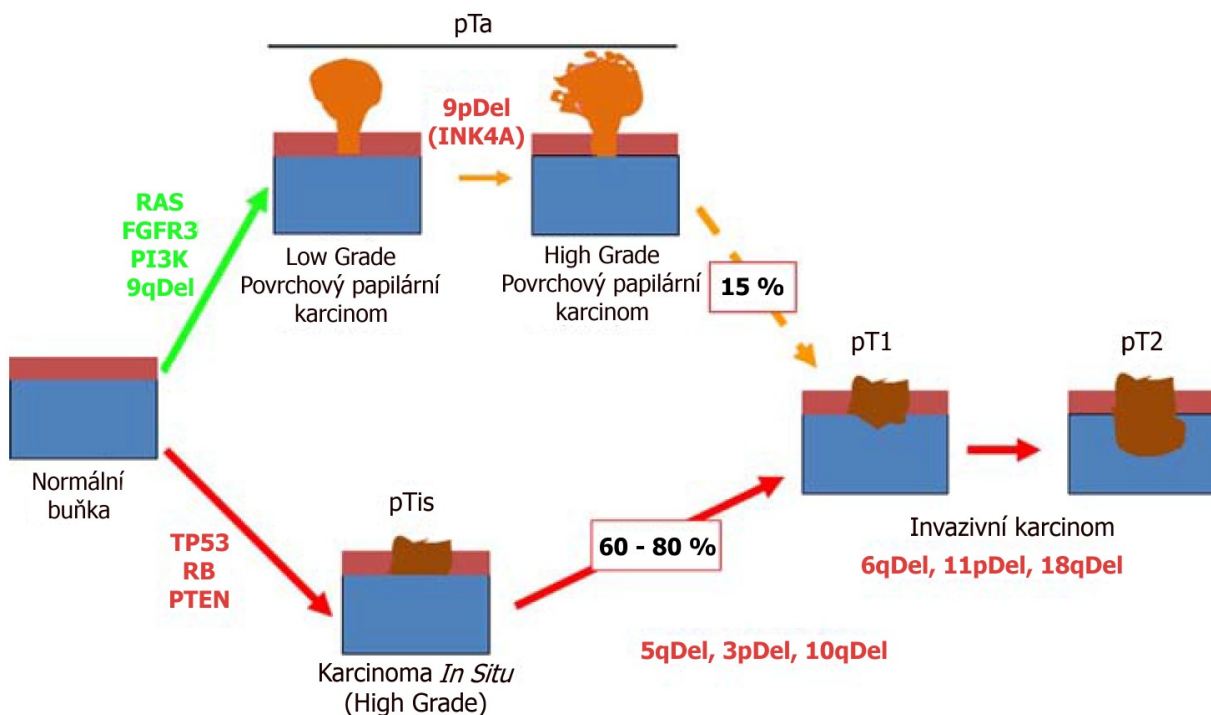
Bylo vyvinuto několik strategií k inhibici proteolytické aktivity proteas, ve snaze zbrzdít metastázující infiltrace. Byly izolovány některé inhibitory katepsinu B, například z mořské bakterie *Pseudomonas*, mořských hub a dalších organismů. Také byly zkoumány flavonoidům podobné látky nepeptidového charakteru se silnými inhibičními vlastnostmi ke katepsinu B. Skupina Parkera a spol. popsala inhibici katepsinu B stefinem A u metastázujících karcinomů prsou a jícnu. Žádný z těchto inhibitorů však nevykazoval účinky vedoucí k potlačení aktivity²⁰.

V současné době se však od těchto chemických a biologických inhibitorů upouští a výzkum se začíná zaměřovat na genové terapie. Současné poznatky ukazují, že samotná inhibice exprese katepsinu B nemá významný účinek na potlačení nádorové aktivity. K efektivnímu potlačení nádorové aktivity dochází, pokud je potlačena exprese další proteolytické molekuly současně s katepsinu B, například MMP-9 či uPA^{32,39}. Byla popsána významná role při potlačování exprese katepsinu B při angiogenezi v glioblastomech, ale i u nádorů slinivky břišní³².

4 Nádory močového měchýře

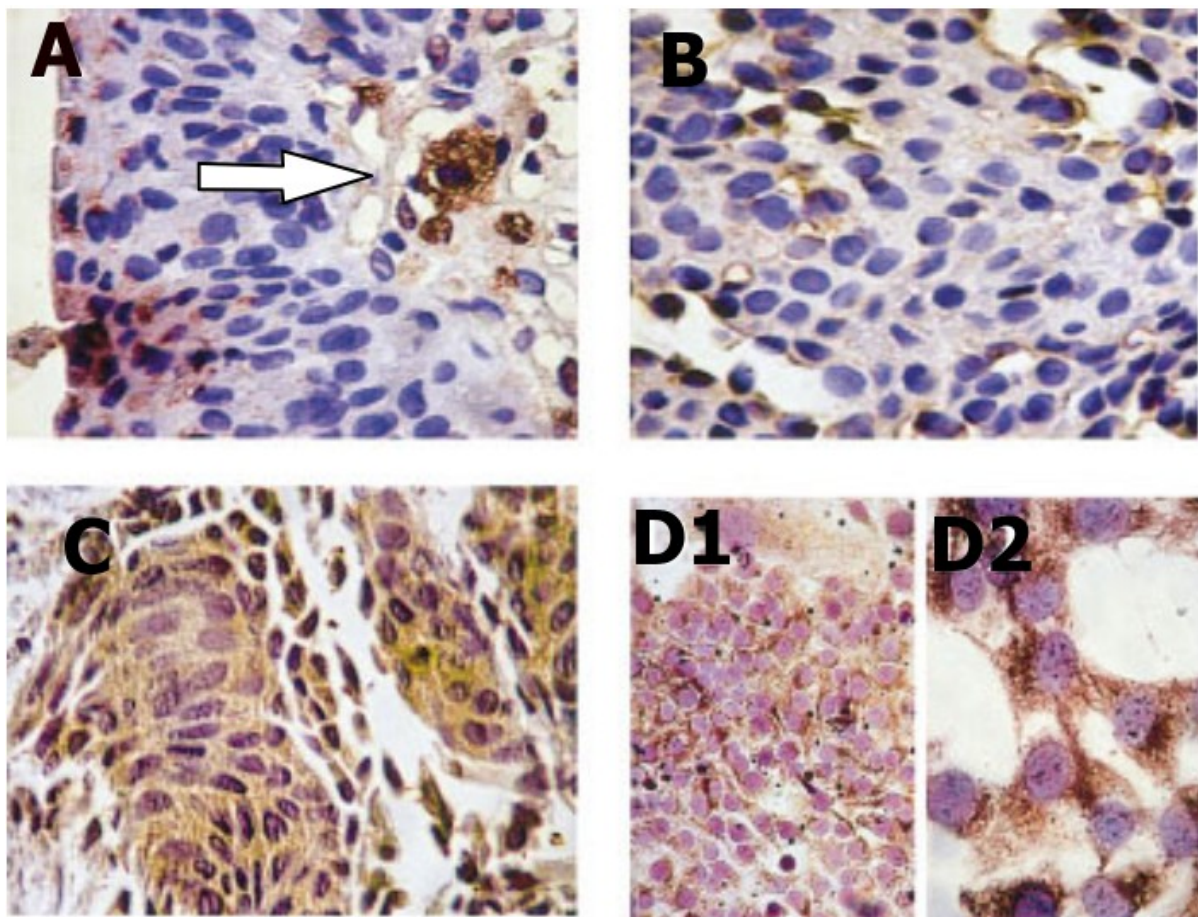
Nádory močového měchýře patří k nejčastějším nádorovým onemocněním. Většina pacientů (kolem 75 %) podléhá epitelovým nádorům (pTa a pTis). Nádory svalové tkáně se projevují u 20 % případů (pT2). Metastázující nádory jsou méně časté (5 % případů). Přestože většina nádorů má sklon k recidivitě, jsou nádorové invaze poměrně nízké. Nádorová onemocnění jsou léčitelná opakovanou resekci či chemoterapií, u 90 % pacientů je 5 leté přežití. Nádorové bujení se projevuje u více jak 50 % případů epitelových nádorů⁴⁰.

Nádory močového měchýře jsou klasifikovány do dvou rozdílných vývojových cest. Odlíší se histologicky, působením odlišných genů a také klinickými projevy (viz obrázek 10). Vznik epitelového pTa nádoru je zapříčiněn mutacemi v onkogenech H-RAS, FGFR3 a PIK3CA. Tento nádor se stává invazivním v 15 % případů. Vznik karcinomu *in situ* je způsoben mutacemi genů TP53, RB, PTEN, které potlačují vznik nádorů. Tento karcinom se stává až v 80 % případů invazivním⁴¹. Mechanizmy vývojových cest uroteliálního karcinomu jsou shrnuty na obrázku 10.



Obrázek 10 – Mechanizmy vývojových cest uroteliálního karcinomu močového měchýře. Delece na p a q ramenu chromozomu – pDel, qDel. RAS – „Rat sarcoma“, FGFR3 – Fibroblastový růstový faktor receptoru 3, PI3K – PI3 kinasa, TP53 – tumorový protein 53, RB – retinoblastom, PTEN – fosfátový homolog⁴¹.

Na Obrázku 11 jsou znázorněny tkáně močového měchýře v různých nádorových stádiích s rozdílnou expresí katepsinu B.



Obrázek 11 – Imunohistochemické detekce katepsinu B v tkáních močového měchýře. A – Fyziologický močový měchýř, s katepsinem v cytoplasmě lumen buněk. Šipka znázorňuje makrofágy s pozitivní skvrnou katepsinu B. B – Grade pT1 karcinomu ukazuje nízkou expresi katepsinu B v cytoplasmě. C - Invazivní karcinom s intenzivní expresí katepsinu B. D – Vysoká exprese katepsinu B v cytoplasmatických vezikulách. Zvětšení D1 – 200x, D2 – 400x²⁷.

Mezi hlavní příčiny vzniku nádorů močového měchýře patří: kouření, které je příčinou vzniku nádorů až v 50 % případů, dalším faktorem je častý výskyt v prostředí s aromatickými aminy (například v textilním průmyslu), nebo také ionizující záření. Přehled hlavních faktorů rizikových pro vznik nádoru je shrnut v tabulce 4⁴².

Tabulka 4 – Rizikové faktory spojované se vznikem nádoru močového měchýře⁴².

| Hlavní příčiny | Neprokázané | Bez spojitosti |
|--|--|----------------|
| Kouření cigaret, doutníků | Pasivní kouření | Anilin |
| Polyaromatické uhlovodíky | Halogenované uhlovodíky | Umělá sladidla |
| Aromatické aminy (Např. naftylamin, benzidin, chloranilin) | Dusičnany a dusitany | Analgetika |
| Vysoká koncentrace arsenu v pitné vodě (> 0,2 mg l ⁻¹) | Nízká koncentrace arsenu v pitné vodě (< 0,2 mg l ⁻¹) | |
| Chronické záněty | Lidský Papillomavirus (HPV) | |
| Imunosupresiva (Cyklosporin, Leflunomid) Fenacetin <i>Aristolochia fangchi</i> Ionizující záření | Nedostatek vitamínu D | |

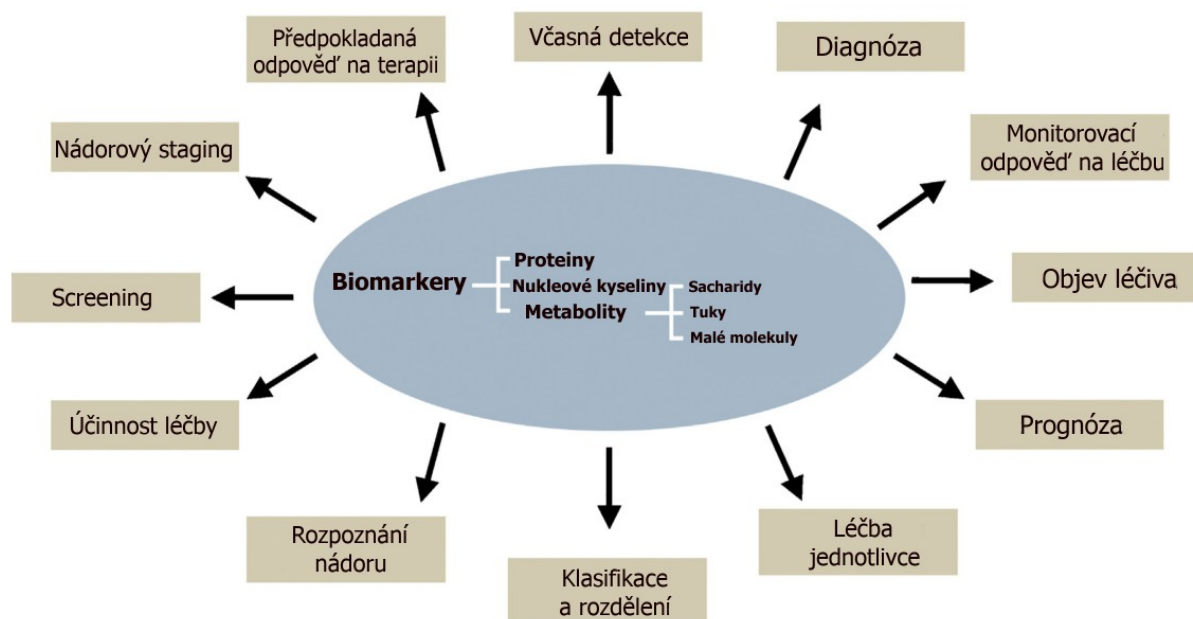
4.1 Nádorové markery

V dnešní době se hledají vhodné biomarkery, které by dokázaly vhodně rozlišit, zda se nachází nádor ve fázi progresu či metastáze a snížily cenu na vynaložené prostředky pro prognózu a léčbu^{40,43}. Takový vhodný marker by měl splňovat podmínky, jak účelu screeningu vysoce rizikových skupin pacientů, tak dohledu nad pacienty s anamnézou nádoru močového měchýře⁴³. Ideální marker by měl být vysoce specifický k danému typu nádoru a velmi citlivý, aby předešel falešně pozitivním výsledkům (viz tabulka 5)⁴⁴.

Tabulka 5 – Charakteristika ideálního markeru⁴⁴.

| Vlastnosti | Charakteristika |
|-------------------------------------|---|
| Vysoká specifita | Detekce pouze 1 typu nádoru |
| Vysoká senzitivita | Bez detekce ve fyziologických stavech |
| Dlouhá doba detekce | Možnost testování při různých stádiích nádoru |
| Hodnoty závislé na velikosti nádoru | Prognóza a předvídatelnost použití nádorového markeru |
| Krátký poločas rozpadu | Častý sériový monitoring hodnot markeru |
| Jednoduchý a levný | Screeningová aplikace |
| Jednoduchost použití | Dosažitelnost pro širokou veřejnost |

Biomarkery nádoru močového měchýře nabízejí mimo jiné informace o biologické charakterizaci nádoru. Slouží k včasné detekci nádorů, diagnóze a prognóze nádorového onemocnění, či poskytují zpětnou vazbu na proces léčby (viz obrázek 12)⁴⁰. V poslední době byla nalezena řada markerů, které jsou významné v klinických souvislostech s diagnózou, zařazením nádorů či prognózou odpovědi pacienta na požadovanou léčbu⁴³. Stále však lze objevovat nové možnosti využití biomarkerů při léčbě nádorů močového měchýře⁴⁰.



Obrázek 12 – Hlavní charakteristiky a funkce biomarkerů⁴⁰.

V několika studiích byla porovnávána klinická senzitivita a specifita nádorových markerů s cytologickými testy. Většina z nich měla pozorovatelně lepší senzitivitu k rozpoznání nádoru močového měchýře (viz tabulka 6). Senzitivita i specifita je u markerů ovlivněna několika faktory, mezi které například patří: v jakém stádiu se daný nádor vyskytuje (grading a staging) či velikost nádoru. Je také prokázána nižší senzitivita u tzv. „low grade“ nádorů. Mnoho markerů také ukazuje nižší specifitu mezi pacienty s benigními urologickými stavy, jako jsou infekce močových cest, cystitida, hematurie, urolitiáza a benigní hyperplazie prostaty⁴⁵. V tabulce 6 jsou popsány biomarkery, které jsou v současné době nejčastěji využívány pro diagnostiku karcinomu močového měchýře.

Tabulka 6 – Současné nádorové markery karcinomu močového měchýře^{45,46}.

| Test / marker | Detekce | Typ testu | Senzitivita (%) | Specifická (%) |
|-------------------------|--|---|---------------------------------|--------------------|
| Cytologie | Nádorové buňky | Mikroskopie | 11-76 | >90 |
| Hematurie | A: Hemoglobin B: Erytrocyty | A: Testovací proužek B: Interferenční-kontrastní mikroskopie | A: 50-90 B: 100 | A: nízká B: 100 |
| BTA-Stat | Komplementární faktor H-příbuzný protein | Imunologický testovací proužek | 36-89 | 50-70 |
| BTA-TRAK | Komplementární faktor H-příbuzný protein | Sendvičová ELISA | 57-83 | 50 |
| NMP-22 | NUMA | Sendvičová ELISA | 47-100 | 55-80 |
| BLCA-4 | Nukleární matrix protein | ELISA | 96,4 | 81-100 |
| Survivin | Inhibitor apoptického genu | Bio-dot test | 100 | 87-100 |
| UBC | Cytokeratin 8, 18 | Sendvičová ELISA | 36-79 | 88-92 |
| Cytokeratin 20 | Cytoskeletální protein | RT-PCR, imunocytologie | 82-87 | 55-70 |
| CYFRA 21-1 | Cytokeratin 19 | Radioimunologický test, elektrochemoluminiscenční imunoanalýza | 75-97 | 67-71 |
| HA-HAase | Kyselina hyaluronová | ELISA | 88-94 | 63-71 |
| Mikrosatelitní DNA test | Mikrosatelitní markery | Genomická DNA PCR | 72-97 | >95 |
| Telomerasa (TRAP) | Enzymová aktivita | TRAP test | 70-90, Nestálé v moči (7-46) | 60-70 |
| Telomerasa (hTERT) | hTERT | RT-PCR | 83-95, 24 | 60-70 |
| ImmunoCyt | Karcinoembriónální antigeny | Imunocytochemicky | 38-90 | 73-80 |
| DD23 | Nádor-asociovaný antigen | Imunocytochemicky | 73-100 | 33-67,5 |
| Katepsiny | Katepsin | Imunochemicky | 33-56 | 87-92 |

Zkratky: BTA-Stat – „Bladder tumor antigen“ test, NMP-22 – „Nuclear matrix protein 22“, BLCA-4 – „B-lymphocyte carcinoma cross-reacting antigen 4“, UBC – Nádory močového měchýře, CYFRA 21-1 – „Cytokeratin fragment 21-1“, HA – kyselina hyaluronová, hTERT – „human reverse transcriptase“, TRAP test – „Telomeric repeat amplification protocol assay“, ELISA – „Enzyme-linked immunosorbent assay“, RT-PCR – Reverzní transkriptázová - polymerázová řetězová reakce.

5 Metody detekce biomarkerů

V dnešní době patří mezi nejčastěji využívané analytické metody enzymatické testy na stanovení sérových koncentrací biomarkerů. Imunologické detekce jsou založeny na monoklonálních protilátkách, které se specificky váží na epitopy nádorových markerů a následně jsou identifikovány různými metodami (viz tabulka 7). Mohou být obarveny v imunohistochemických testech, radioaktivně označeny v radioimunologických testech či enzymaticky zachyceny v metodě ELISA⁴⁴.

Tabulka 7 – Metody detekce tumorových markerů^{44,47}.

| Serologie | Enzymatický testy |
|-----------------------|---|
| Imunologie | Imunohistochemické Imunofluorescenční Radioimunologické ELISA |
| Fluidní cytometrie | |
| Cytogenetické analýzy | FISH Spektrální karyotyp Komparativní genomická hybridizace LC-MS/MS |
| Genetické analýzy | Sekvenování Gelová elektroforéza DNA čipování Western Blot |
| Proteomika | SELDI |

Zkratky: ELISA - „Enzyme-linked immunosorbent assay“, FISH – Fluorescenční hybridizace in situ, SELDI – Povrchem zvýšená laserová desorpce/ionizace, LC-MS/MS – Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

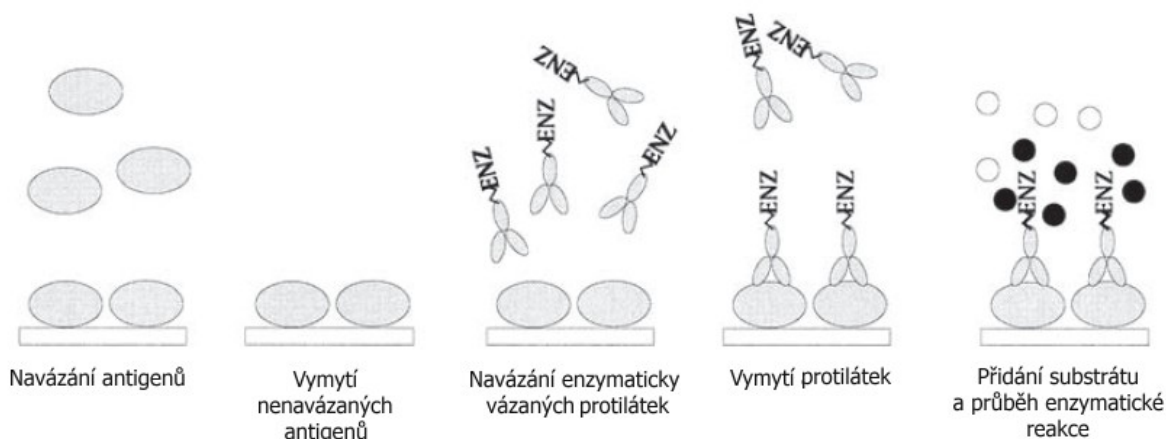
5.1 Imunochemické stanovení nádorových markerů

Imunochemická metoda ELISA je široce používaná k diagnostickým účelům v medicíně, ke kontrole měření kvality výrobků v průmyslu. Hlavním konceptem imunitních reakcí je navázání antigenu ke specifické protilátce, což umožňuje kvantitativně detekovat antigeny ve formě proteinů, hormonů nebo protilátek v tekutém roztoku⁴⁸.

Metody ELISA se dají rozdělit podle několika parametrů na přímou a nepřímou, kompetitivní a nekompetitivní, podle druhu vázaných látek, zda stanovujeme protilátky či antigeny a metodu sendvičovou^{48,49}. Dále jsou uvedené jednotlivé principy:

- Přímá

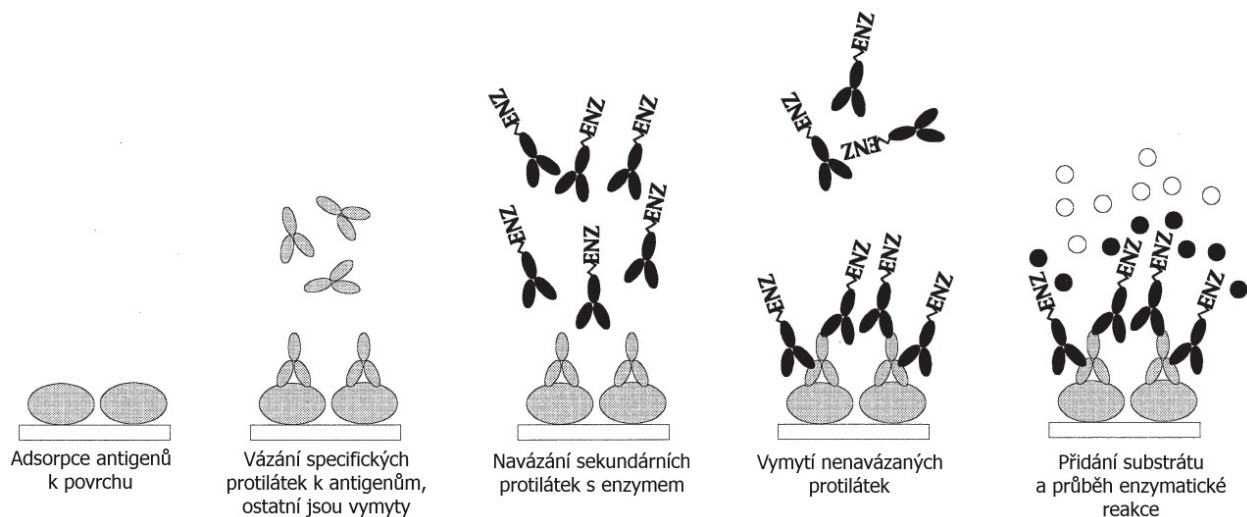
Jedná se o jednoduchý typ metody ELISA. Nejdříve jsou antigeny ze vzorku navázány k povrchu mikrotitrační destičky (viz obrázek 13). Následuje promytí a navázání protilátek s navázaným enzymem. Po přidání substrátu je substrát enzymaticky přeměněn a následná barevná změna je odezvou koncentrace látky ze vzorku⁴⁹.



Obrázek 13 – Průběh enzymatické metody přímá ELISA⁴⁹.

- Nepřímá

Analyzovaný antigen ve vzorku je přichycen na jamkách mikrotitrační destičky, následně je přidán roztok nereaktivního proteinu (například hovězí sérový albumin), který zablokuje prázdné jamky, do kterých se antigen nenavázal. Poté jsou přidány primární protilátky, které se specificky naváží na antigeny. Následně se na ně naváží sekundární protilátky s enzymem, který reaguje s přidáním substrátem (viz obrázek 14). Koncentrace primárních protilátek odpovídá intenzitě zabarvení roztoku⁴⁸.

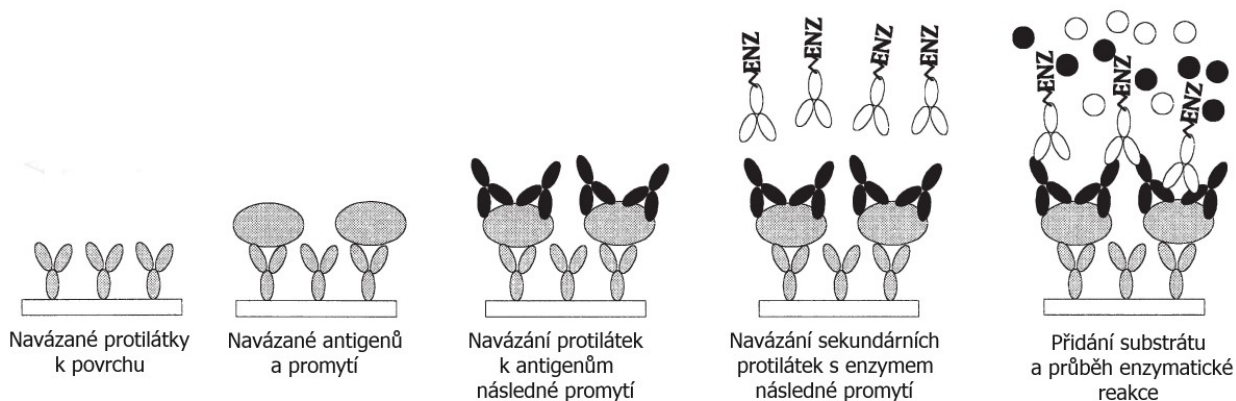


Obrázek 14 – Průběh enzymatické metody nepřímá ELISA⁴⁹.

- Sendvičová

Na povrchu jamek v mikrotitračních destičkách je navázáno známé množství protilátky, na kterou se váže požadovaný antigen. Následně je přidána specifická primární protilátka, na kterou se později váže sekundární protilátka s enzymem. Substrát po přidání je enzymaticky přeměněn a nastane barevná změna, která je kvantitativně měřena (viz obrázek 15). Koncentrace antigenu odpovídá přímo barevné změně roztoku.

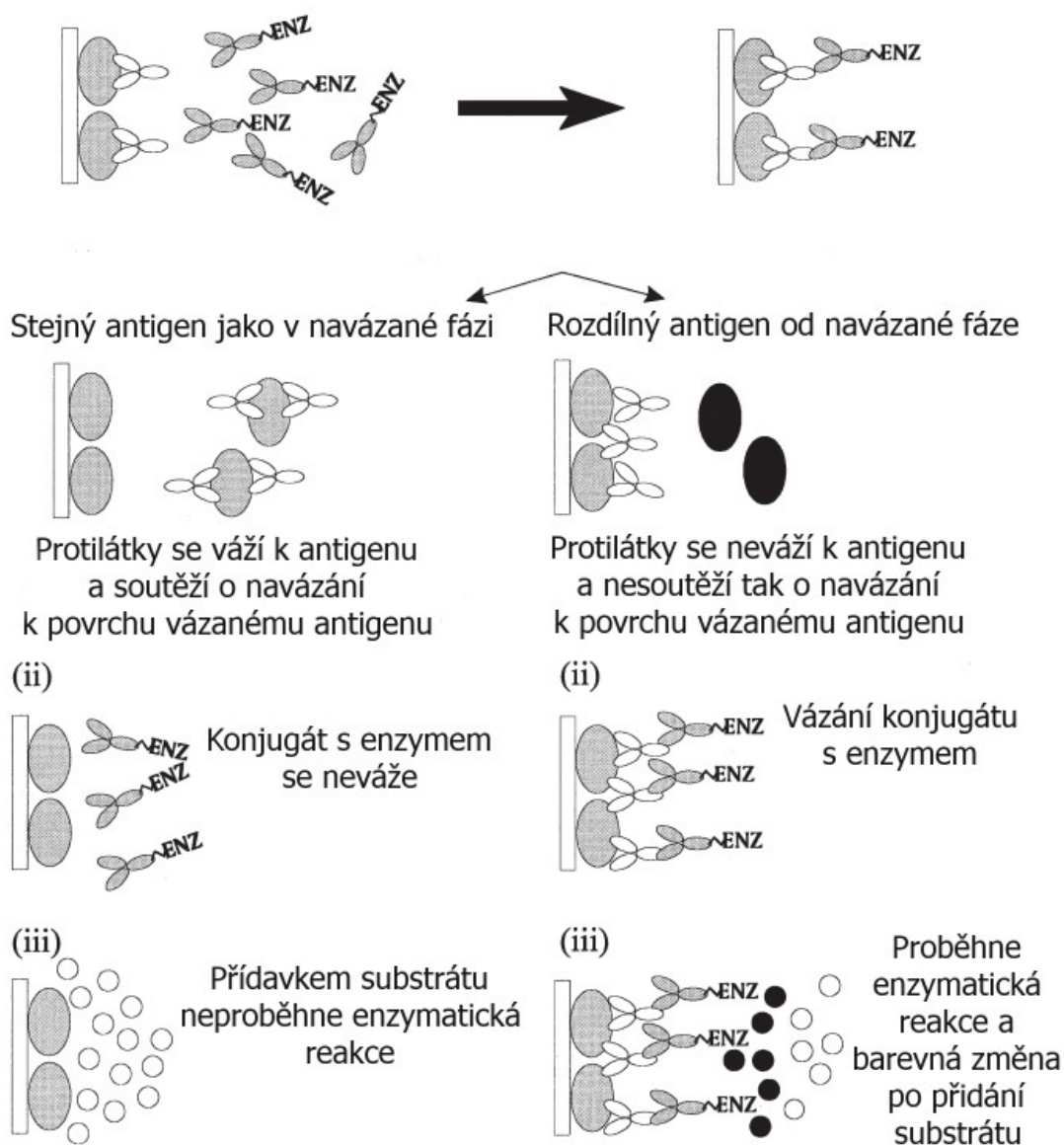
Výhodou této metody je její vysoká specifická a citlivost, zajištěná použitím specifické protilátky, což umožňuje stanovovat antigen ve směsi s jinými antigeny⁴⁸.



Obrázek 15 – Průběh enzymatické metody nepřímá sendvičová ELISA⁴⁹.

- Kompetitivní

Kompetitivní reakce nastává mezi antigenem ve vzorku a antigenem. Nejdříve je protilátka s antigenem inkubována, za vzniku komplexu protilátka-antigen (viz obrázek 16). Tento komplex je přidán do jamek, které byly navázány stejným antigenem. Po inkubaci jsou nenavázané protilátky vymyty. Čím více antigenu je ve vzorku, tím více primárních protilátek bude navázáno k antigenu ve vzorku. Následně jsou navázány sekundární protilátky s enzymem. Substrát poté vyvolá barevný signál. Vyšší odezva signálu, odpovídá nižší koncentraci antigenu ve vzorku. Hlavní výhodou této metody je její citlivost k rozdílným antigenům ve směsi⁴⁸.



Obrázek 16 – Průběh enzymatické metody nepřímá kompetitivní ELISA⁴⁹.

6 Cíl práce

- 1) Stanovit koncentraci aktivní a neaktivní formy katepsinu B v moči a v séru u pacientů s karcinomem močového měchýře enzymovými imunochemickými metodami.**

- 2) Porovnat diagnostické účinnosti metod s ohledem na jejich využití pro rutinní diagnostiku pacientů s karcinomem močového měchýře.**

7 Experimentální část

7.1 Stanovení katepsinu B v séru a v moči

7.1.1 Instrumentace, Reagencie

- Reagenční sada ELISA Kit pro katepsin B (Cloud-Clone Corporation, USA)
 - katalogové číslo SEC964Hu
 - Reagencie obsažené v kitu jsou uvedeny v tabulce 8

Tabulka 8 – Reagencie obsažené v kit soupravě pro katepsin B⁵⁰.

| Reagencie | Množství, specifikace |
|--|---|
| Mikrotitrační destičky katepsin B | 96 jamek potažených myší monoklonální protilátkou proti katepsinu B |
| Standard | 2 |
| Ředící roztok standardu (Standard Diluent) | 1 x 20 ml |
| Detekční činidlo A (Detection Reagent A) | 1 x 120 µl |
| Detekční činidlo B (Detection Reagent B) | 1 x 120 µl |
| Ředící roztok A (Assay Diluent A) | 1 x 12 ml |
| Ředící roztok B (Assay Diluent B) | 1 x 12 ml |
| TMB substrát (TMB Substrate) | 1 x 9 ml stabilního peroxidu vodíku a tetramethylbenzidinu |
| Stop roztok (Stop Solution) | 1 x 6 ml 2 M kyseliny sírové |
| Promývací roztok (Wash Buffer) | 1 x 20 ml (30 x koncentrovaný) |

- Spektrofotometr TECAN Sunrise (Tecan, Rakousko)
 - software Magellan Clinical verze 4.2
- Lednice Liebeherr s monitorováním teplot pomocí systému Falcon
- Centrifuga ALC 4214 (ALC International s.r.o., Itálie)
- Termostat (VWR Incu line, Německo)
- Vortex
- Automatické mikropipety 10 – 1000 μ l (Biohit, Finn pipette)

7.1.2 Princip enzymového testu

Metoda je založená na nekompetitivní metodě ELISA sendvičového typu. Dodávaná souprava kitu slouží ke kvantitativní analýze katepsinu B v lidském séru, plasmě, homogenizovaných tkáních a v dalších biologických tekutinách⁵⁰.

Mikrotitrační destička dodávaná v kitu je potažena specifickými protilátkami pro katepsin B. Do jamek jsou pipetovány standardy a vzorky. Dále jsou přidány protilátky specifické pro katepsin B značené biotinem. Avidin-peroxidasa je přidána do každé jamky. Vzniká tak sendvičový komplex antigenu s protilátkou. Po přidání TMB substrátu proběhne reakce pouze u jamek, které obsahují komplex katepsinu B s protilátkou vázanou s biotinem a enzymově konjugovaným avidinem. Reakce je zastavena přidáním kyseliny sírové a barevná změna je měřena při 450 nm. Koncentrace katepsinu B u vzorků je určena odečtením absorbance vzorků z kalibrační křivky⁵⁰.

7.1.3 Analytické znaky metody

Analytické znaky metody byly převzaty z dokumentace poskytnuté výrobcem (viz tabulka 9)⁵⁰.

Tabulka 9 – Přehled analytických znaků metody⁵⁰.

| Znaky metody | Hodnota | | | |
|--|--------------------------|-------|-------|--------|
| Pracovní rozsah metody | 0,312 – 20 µg/l | | | |
| Výtěžnost (recovery) pro sérum | 90 % (rozmezí 82 – 97 %) | | | |
| Linearita v procentech vztažené k teoretické hodnotě pro různé koncentrace | 1 : 2 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 |
| Opakovatelnost CV | < 10 % | | | |
| Reprodukovatelnost CV | < 12 % | | | |

CV – Variační koeficient

7.1.4 Pracovní postup

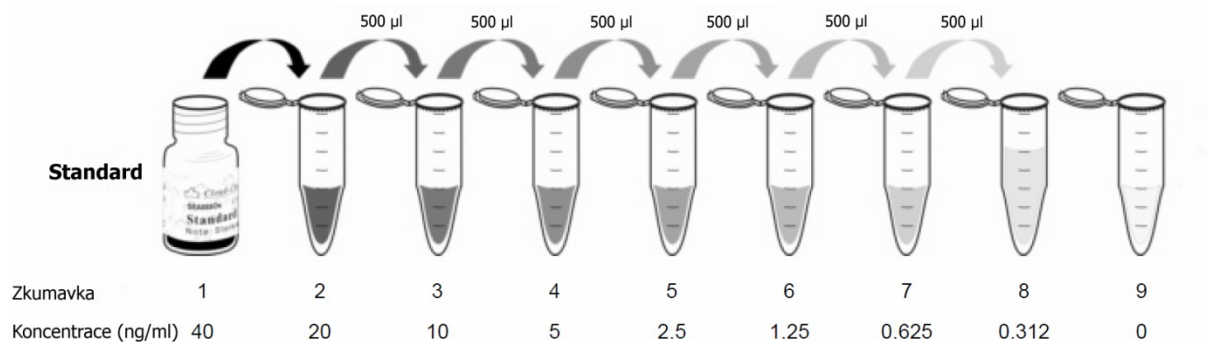
Pro přípravu séra se nechá odebraná krev srážet ve zkumavkách se separačním gelem a aktivátorem srážení po dobu dvou hodin při pokojové teplotě. Poté se krev centrifuguje po dobu 20 minut při 1000 x g. Sérum je odděleno a vzorky lze buď ihned měřit, či je uschovat v alikvotech při – 20 °C, aby se předešlo opětovnému rozmrazování vzorku.

U moči se provádí ranní odběr, kdy je moč koncentrovanější a s nižším pH, do předurčených plastových zkumavek. K odstranění nežádoucích částic je využito centrifugace, následně lze moč ihned analyzovat či zmrazit v alikvotech při – 20 °C^{4,50}.

Příprava reagensí:

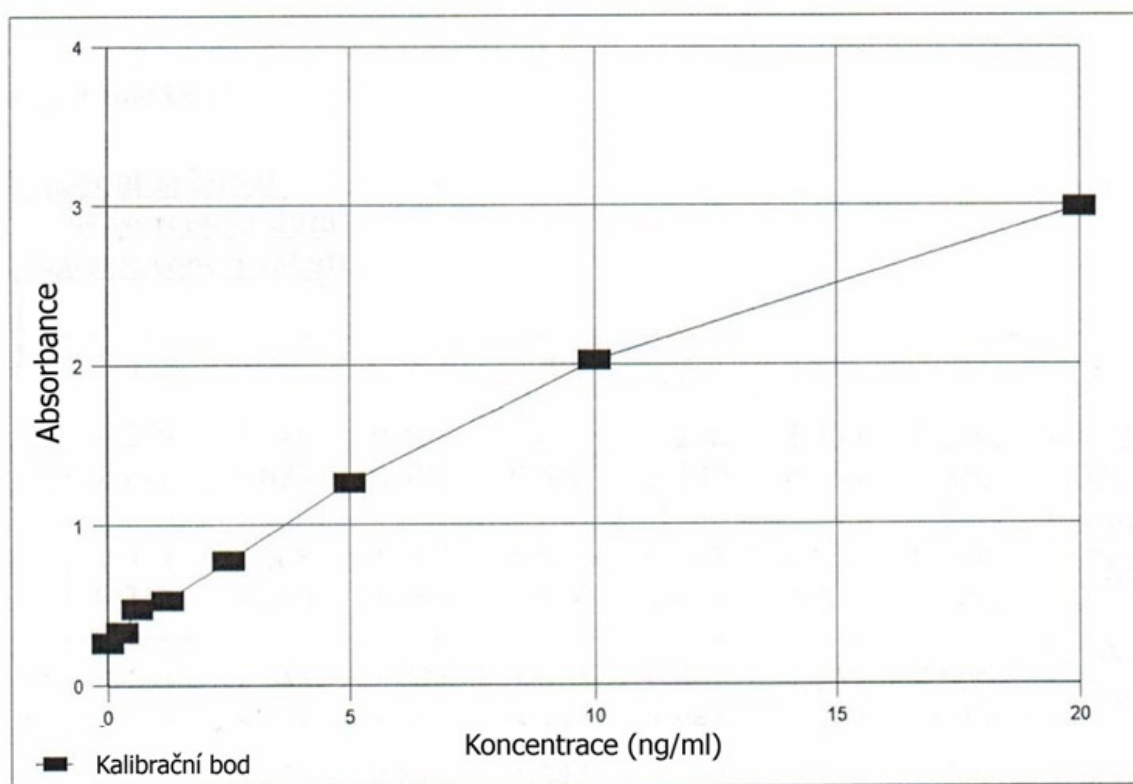
- Před použitím byla celá sada kitu temperována při pokojové teplotě.
- Nejprve byl připraven standard o koncentraci 40 ng/ml, tuhá fáze standardu byla naředěna 1,0 ml standardního roztoku. Standard byl jemně promíchán a ponechán 10 minut při pokojové teplotě.
- Ze standardu byla připravena sedmi bodová kalibrační řada (viz obrázek 17). Kalibrace byla připravena postupným ředěním. Nejprve bylo do všech zkumavek

pipetováno 500 μ l standardního roztoku, následně proběhlo ředění dvojkovou řadou dle obrázku 17. Grafy kalibračních křivek jsou znázorněny na obrázcích 18 a 19. Charakter křivek odpovídá charakteru křivek předepsaný výrobcem.

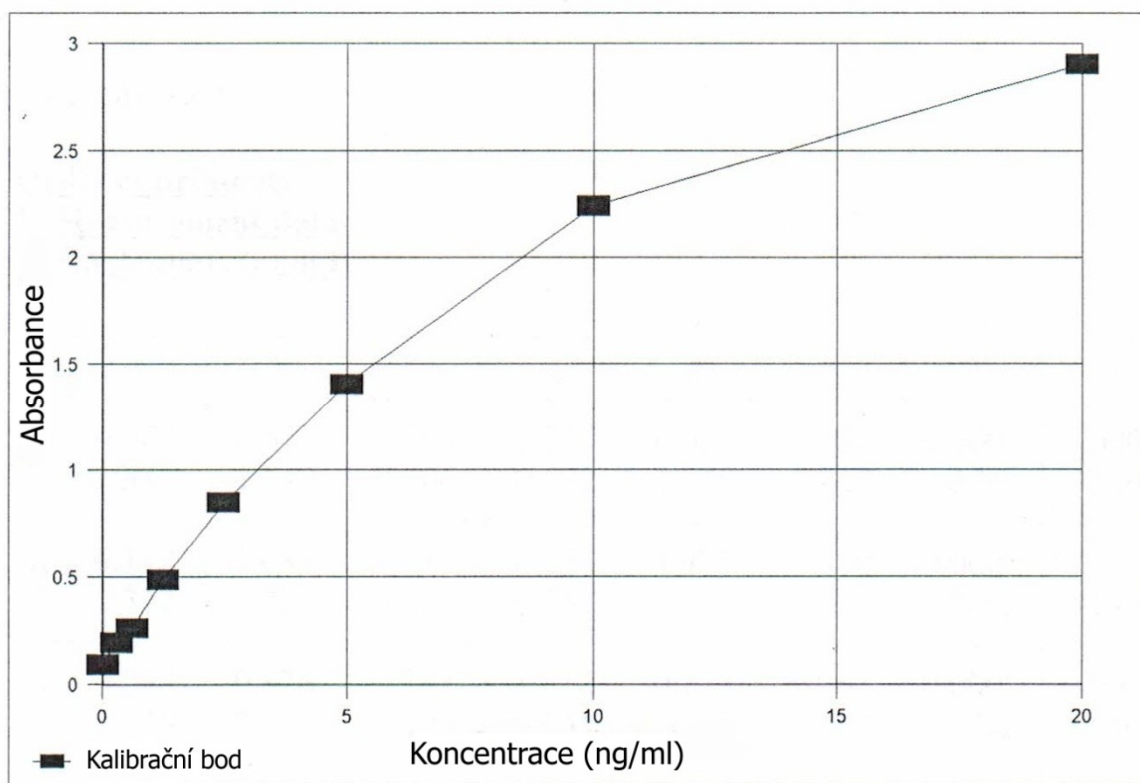


Obrázek 17 – Kalibrační řada pro katepsin B.

- Detekční činidla A a B byla ředěna ředícími roztoky A a B v poměru 1 : 100. K 120 μ l detekčního činidla bylo přidáno 11 880 μ l ředícího roztoku.
- Promývací roztok byl připraven z 30 x koncentrovaného promývacího roztoku, naředěním destilovanou vodou na celkový objem 600 ml.



Obrázek 18 – Příklad kalibrační křivky pro sérum.



Obrázek 19 – Příklad kalibrační křivky pro moč.

Pracovní postup:

- Do příslušných jamek na mikrotitrační destičce bylo pipetováno 100 μ l od každého standardu, měřených vzorků a slepý vzorek (ředící roztok standardu). Jamky byly zakryté ochranou folií a inkubovány v termostatu při 37 $^{\circ}$ C po dobu 2 hodin.
- Po inkubaci byla odsáta tekutá fáze z jamek za pomoci vývěvy a do každé jamky bylo přidáno 100 μ l detekčního činidla A. Destička byla zakryta folií a inkubována 1 hodinu při 37 $^{\circ}$ C.
- Jamky byly odsáty na automatické promývače a následně 3 x promyty promývacím roztokem. Promývání probíhalo 350 μ l promývacího roztoku, který byl pokaždé v destičce ponechán na 90 sekund a následně byl odsát.
- Do jamek bylo přidáno 100 μ l detekčního roztoku B a opět byly jamky zakryty folií a inkubace probíhala 30 minut při 37 $^{\circ}$ C.
- Jamky byly 5 x promyty na automatické promývače, jako v předešlém kroku.
- Do jamek se přidalo 90 μ l TMB substrátu a inkubování probíhalo po dobu 15 - 25 minut při 37 $^{\circ}$ C. Bylo potřeba destičku chránit před světlem.

- Do jamek bylo přidáno 50 µl stop roztoku a nastala změna barvy v jamkách z modré na žlutou.
- Mikrotitrační destička byla proměřena na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm.

7.2 Stanovení prokatepsinu B v séru a v moči

7.2.1 Instrumentace, Reagencie

- Sada Quantikine ELISA Human Pro-Cathepsin B (R&D System, USA)
 - Katalogové číslo DCATB0
 - Reagencie obsažené v kitu jsou uvedeny v tabulce 10

Tabulka 10 – Reagencie obsažené v kit soupravě pro prokatepsin B⁵¹.

| Reagencie | Množství, specifikace |
|---|--|
| Mikrotitrační destičky prokatepsin B | 96 jamek potažených myší monoklonální protilátkou proti prokatepsinu B |
| Prokatepsin B standard | 1 x 100 ng |
| Konjugát prokatepsinu B | 1 x 21 ml |
| Ředící roztok RD1-34 (Assay diluent RD1-34) | 1 x 11 ml |
| Koncentrovaný ředící kalibrátor RD5-34 (Calibrator Diluent RD5-34 Concentrate) | 1 x 21 ml |
| Koncentrovaný pufr 3 (Cell lysis buffer 3 concentrate) | 1 x 21 ml |
| Koncentrovaný promývací roztok (Wash buffer concentrate) | 1 x 21 ml |
| Barevné činidlo A (Color reagent A) | 1 x 12 ml stabilního peroxidu vodíku |
| Barevné činidlo B (Color reagent B) | 1 x 12 ml tetramethylbenzidinu |
| Stop roztok (Stop solution) | 1 x 6 ml 2M kyseliny sírové |

- Spektrofotometr TECAN Sunrise (Tecan, Rakousko)
 - software Magellan Clinical verze 4.2
- Lednice Liebeherr s monitorováním teplot pomocí systému Falcon
- Centrifuga ALC 4214 (ALC International s.r.o., Itálie)
- Termostat (VWR Incu line, Německo)
- Vortex
- Automatické mikropipety 10 – 1000 µl (Biohit, Finn pipette)

7.2.2 Princip enzymového testu

Metoda slouží k stanovení koncentrace lidského prokatepsinu B v séru, plasmě, slinách, moči a v buněčných tekutinách. Jedná se o kvantitativní enzymovou imunoanalýzu sendvičového typu. Metoda využívá monoklonálních protilátek specifických pro katepsin B, které jsou navázané v jamkách na mikrotitrační destičce. Vzorky a standardy jsou pipetovány do jamek destičky a prokatepsin B je vázán k imobilizovaným protilátkám. Po promytí jsou odstraněny všechny nenavázané substance a jsou přidány enzymově vázané protilátky pro katepsin B. Nenavázané protilátky jsou vymyty a je přidán substrát, který způsobí barevnou změnu v závislosti na koncentraci prokatepsinu B. Reakce je zastavena roztokem kyseliny sírové a barevná změna je měřena při 450 nm. Koncentrace prokatepsinu B je stanovována odečtením absorbance z kalibrační křivky⁵¹.

7.2.3 Analytické znaky metody

Analytické znaky metody byly převzaty z dokumentace poskytnuté výrobcem a jsou uvedeny v tabulce 11 a 12⁵¹.

Tabulka 11 – Přehled analytických znaků metody pro sérum⁵¹.

| Znaky metody | Hodnota | | | |
|---|----------------|-------|-------|--------|
| Pracovní rozsah metody | 27 – 126 ng/ml | | | |
| Linearita v procentech vztažená k teoretické hodnotě pro různé koncentrace prokatepsinu B | 1 : 2 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 |
| Opakovatelnost CV | < 5,4 % | | | |
| Reprodukovatelnost CV | < 7,8 % | | | |

CV – Variační koeficient

Tabulka 12 – Přehled analytických znaků metody pro moč⁵¹.

| Znaky metody | Hodnota | | | |
|---|----------------|-------|-------|--------|
| Pracovní rozsah metody pro sérum | 0 – 2,54 ng/ml | | | |
| Linearita v procentech vztažená k teoretické hodnotě pro různé koncentrace prokatepsinu B | 1 : 2 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 |
| Opakovatelnost CV | < 4,8 % | | | |
| Reprodukovatelnost CV | < 7,0 % | | | |

CV – Variační koeficient

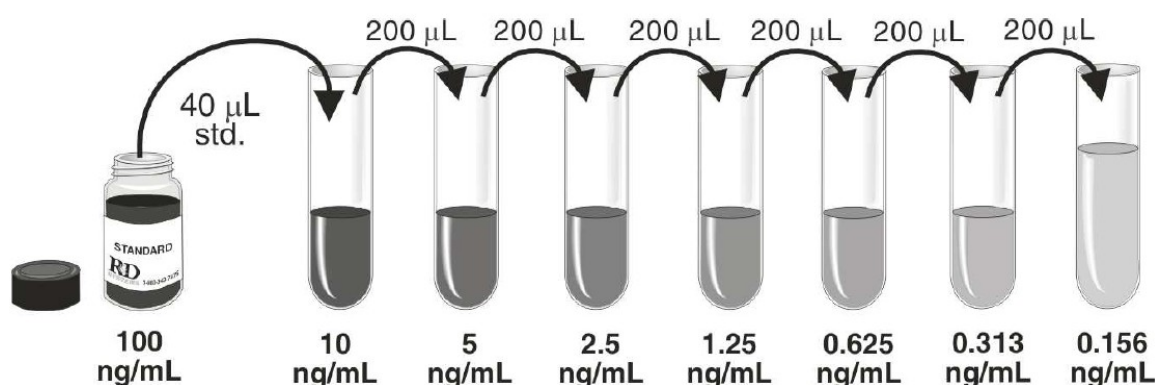
7.2.4 Pracovní postup

Pro přípravu séra se nechá odebraná krev srážet ve zkumavkách se separačním gelem a aktivátorem srážení po dobu dvou hodin při pokojové teplotě. Poté se krev centrifuguje po dobu 15 minut při 1000 x g. Sérum je odděleno a vzorky lze buď ihned měřit, či je uschovat v alikvotech při – 20 °C, aby se předešlo opětovnému rozmrazování vzorku.

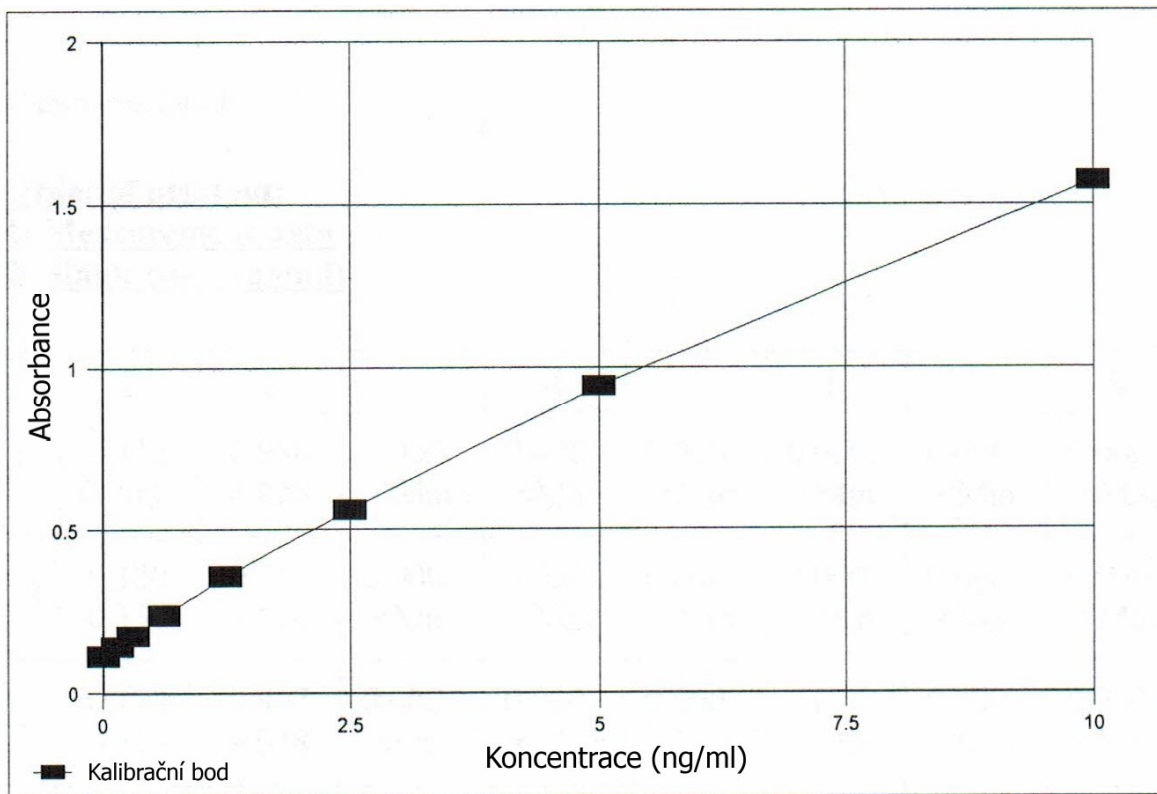
U moči se provádí ranní odběr, kdy je moč koncentrovanější a s nižším pH, do předurčených plastových zkumavek. K odstranění nežádoucích částic je využito centrifugace, následně lze moč ihned analyzovat či zmrazit v alikvotech při – 20 °C⁵¹.

Příprava reagensí:

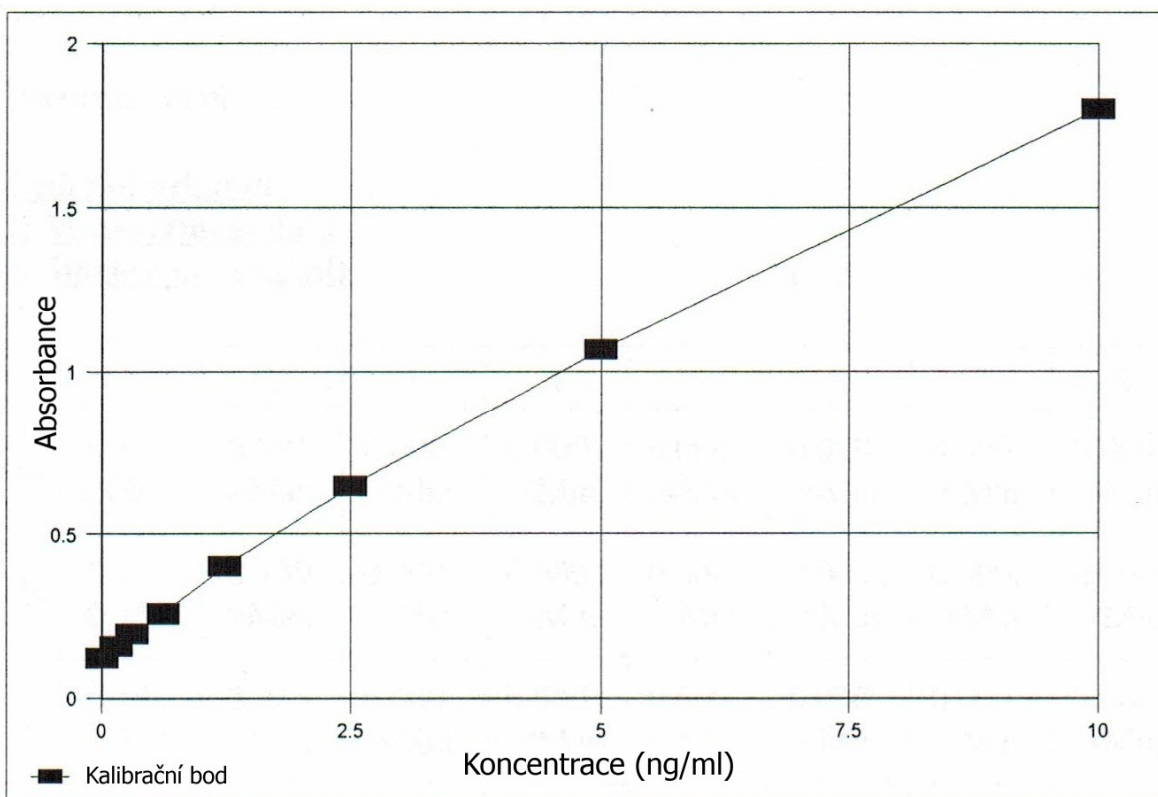
- Vzorky séra byly ředěny 20x koncentrovaným ředícím kalibrátorem RD5-34.
- Vzorky moči byly ředěny 2x koncentrovaným ředícím kalibrátorem RD5-34.
- Barevné činidla byla smíchána 15 minut před použitím.
- 100 ng standardu bylo rozpuštěno 1,0 ml destilované vody.
- Ředící kalibrátor byl připraven naředěním 10 ml koncentrovaného kalibrátoru RD1-34 10 ml destilované vody.
- Promývací roztok byl připraven zředěním 20 ml koncentrovaného promývacího roztoku destilovanou vodou do celkového objemu 500 ml.
- Kalibrační řada byla připravena přidáním 40 μ l standardu do 360 μ l ředícího kalibrátoru. Dále proběhlo ředění dvojkovou řadou (viz obrázek 20). Grafy kalibračních křivek jsou znázorněny na obrázcích 21 a 22, jejich charakter odpovídá charakteru křivek předepsaný výrobcem.



Obrázek 20 – Kalibrační řada pro prokatepsin B⁵¹.



Obrázek 21 – Příklad kalibrační křivky pro sérum.



Obrázek 22 – Příklad kalibrační křivky pro moč.

Pracovní postup:

- Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l ředícího roztoku RD1-34.
- Do příslušných jamek bylo pipetováno 50 μ l standardů, vzorků a slepého vzorku. Destička byla zalepena folií a inkubována po dobu 2 hodin při 2 – 8 °C.
- Jamky byly 4 x promyty 400 μ l promývacího roztoku.
- Dále bylo přidáno 200 μ l konjugátu prokatepsinu B. Destička byla zalepena folií a inkubována 2 hodiny při 2 – 8 °C
- Jamky byly opět 4 x promyty 400 μ l promývacího roztoku.
- Následně se pipetovalo 200 μ l roztoku substrátu (směs barevných činidel A a B) a inkubace probíhala 30 minut při pokojové teplotě, chráněné proti světlu.
- K zastavení reakce bylo použito 50 μ l stop roztoku.
- Barevná intenzita byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm s korekcí 540 či 570 nm.

7.3 Stanovení kreatininu

Kreatinin vzniká dehydratací kreatinu a fosfokreatinu. Kreatinin je stanovován v séru i moči a především je využíván k vyšetření funkčnosti ledvin (kreatinová clearance). Jeho koncentrace v krvi je úměrná svalové hmotě a jeho stabilní koncentrace je narušena pouze onemocněním ledvin. Ke stanovení kreatininu se využívají enzymatické i chemické metody^{4,52}.

Zvýšená koncentrace katepsinu B v moči nastává u pacientů při maligních stavech, což může být způsobeno zvýšenou glomerulární filtrací či diurézou. K eliminaci vlivu diurézy se provádí korekce koncentrace katepsinu B v moči na kreatinin. Koncentrace katepsinu B v moči je vyjádřena v μ g katepsinu B na mmol kreatininu^{4,46}.

Kreatinin byl měřen z důvodu eliminace vlivu diurézy. Katepsin B je totiž při maligních stavech vylučován do moči, čím může být jeho koncentrace zvýšená

V této práci byl kreatinin stanoven enzymaticky, pomocí kaskádových reakcí. Nejdříve byl kreatinin přeměněn na kreatin, který byl enzymaticky převeden na konečné produkty reakce v podobě peroxidu vodíku a nikotinamidadeninukleotidu (NAD)⁴. Pokles NADH byl stanoven fotometricky jako pokles absorbance při 340 nm a koncentrace úbytku NADH byla úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku.

V moči se kreatinin stanovoval enzymatickou kreatindeaminasovou metodou. Referenční hodnoty pro kreatinin byly 5,7 – 14,7 mmol/l⁴.

7.4 Statistická analýza

Pro statistické zpracování naměřených dat byl použit neparametrický Mann-Whitneyův U-test, kterým byly sledovány rozdíly mezi skupinami. Za statisticky významné se považovaly hodnoty na hladině významnosti $P < 0,05$. Diagnostická účinnost byla vyhodnocena pomocí ROC analýzy. Pro statistické analýzy dat byl použit program GraphPad Prism 6.

7.5 Charakteristika pacientů a kontrolní skupiny

Vzorky moče a séra pacientů s karcinomem močového měchýře byly zamrazeny a udržovány při teplotě -70°C . Koncentrace katepsinu B a prokatepsinu B v moči a séru byla měřena u pacientů a kontrolní skupiny (viz tabulka 13). Počet pacientů činil 82 vzorků, v zastoupení 47 mužů a 35 žen, s průměrným věkem 66,5 let. Kontrolní skupina obsahovala 72 vzorků, z toho 31 mužů a 41 žen, s průměrným věkem 58,5 let.

Tabulka 13 – Charakteristika pacientů a kontrolní skupiny.

| Název | Kontrolní skupina | Pacienti |
|------------------------------|--------------------------|-----------------|
| Počet | 72 | 82 |
| Muži / ženy | 31 / 41 | 47 / 35 |
| Průměrný věk (roky) (rozsah) | 58,5 (23 - 92) | 66,5 (43 – 83) |

8 Výsledky

U pacientů s karcinomem močového měchýře byly nalezeny statisticky významné rozdíly v koncentracích katepsinu B i prokatepsinu B. Katepsin B byl významně zvýšen ($P = 0,0109$) u pacientů v moči oproti kontrolní skupině, také poměr katepsinu B na kreatinin je statisticky významný ($P = 0,0123$). U prokatepsinu B jsou hodnoty u pacientů významně zvýšeny v moči i séru, a také u poměru prokatepsinu B na kreatinin. Souhrn získaných výsledků je uveden v tabulce 14 pro katepsin B a v tabulce 15 pro prokatepsin B. Signifikantní rozdíly mezi sledovanými analyty ve skupinách jsou znázorněny tučně.

Tabulka 14 – Statistická data pro katepsin B.

| Název | Kontrolní skupina (n = 72) | Pacienti (n = 82) | P – hodnota P < 0,05 |
|--|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| S-katepsin B ($\mu\text{g/l}$) medián (rozsah) | 4,24 (0,07 – 16,79) | 4,80 (0,47 – 16,16) | 0,7517 |
| U-katepsin B ($\mu\text{g/l}$) medián (rozsah) | 0,90 (0,14 – 19,40) | 3,55 (0,11 – 19,87) | 0,0109 |
| U-kreatinin (mmol/l) medián (rozsah) | 8,0 (2,3 – 28,2) | 7,9 (1,1 – 28,3) | 0,7675 |
| U-katepsin B/U-kreatinin ($\mu\text{g}/\text{mmol}$) medián (rozsah) | 0,12 (0,02 – 3,88) | 0,39 (0,02 – 11,63) | 0,0123 |

S- sérum, U- moč.

Tabulka 15 – Statistická data pro prokatepsin B.

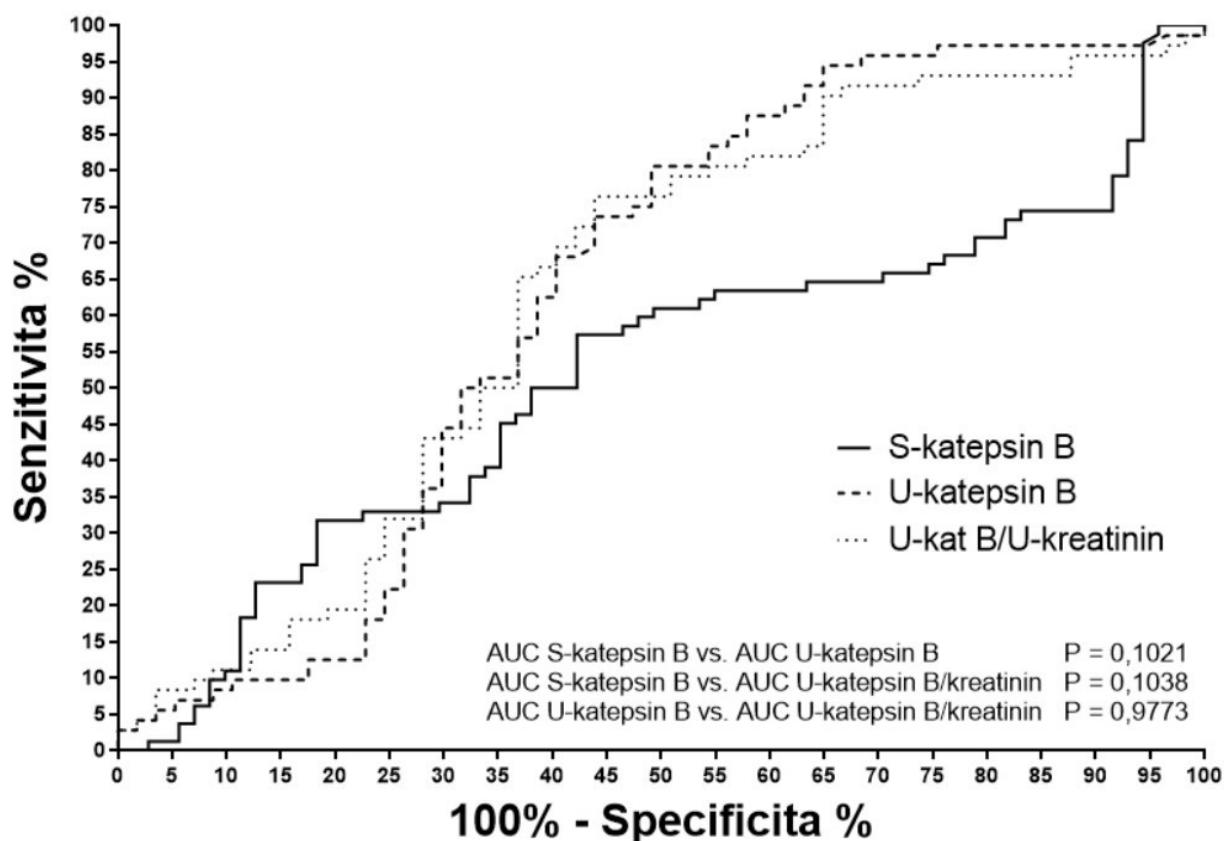
| Název | Kontrolní skupina (n = 72) | Pacienti (n = 82) | P – hodnota P < 0,05 |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| S-prokatepsin B ($\mu\text{g/l}$) medián (rozsah) | 58,66 (24,06 – 163,88) | 73,34 (30,16 – 188,72) | 0,0005 |
| U-prokatepsin B ($\mu\text{g/l}$) medián (rozsah) | 1,35 (0,42 – 16,78) | 3,94 (0,77 – 122,92) | < 0,0001 |
| U-kreatinin (mmol/l) medián (rozsah) | 8,0 (2,3 – 28,2) | 7,9 (1,1 – 28,3) | 0,7675 |
| U-prokatepsin B/U-kreatinin ($\mu\text{g}/\text{mmol}$) medián (rozsah) | 0,19 (0,03 – 2,21) | 0,56 (0,12 – 32,35) | < 0,0001 |

Byla sledována diagnostická efektivita katepsinu B a prokatepsinu B. Katepsin B vykazuje vyšší diagnostickou efektivitu pro nádor močového měchýře u hodnot katepsinu B měřených v moči (AUC = 0,63) oproti hodnotám v séru (AUC = 0,52). Shrnutí výsledků je v tabulce 16 a grafické zobrazení srovnání ROC křivek je na obrázku 23.

Tabulka 16 – Porovnání diagnostické efektivity katepsinu B v séru a v moči.

| Název | AUC (95% interval spolehlivosti) |
|------------------------------------|----------------------------------|
| S-katepsin B (μg/l) | 0,52 (0,42 – 0,61) |
| U-katepsin B (μg/l) | 0,63 (0,53 – 0,73) |
| U-katepsin B/U-kreatinin (μg/mmol) | 0,62 (0,53 – 0,73) |

S- sérum, U- moč.



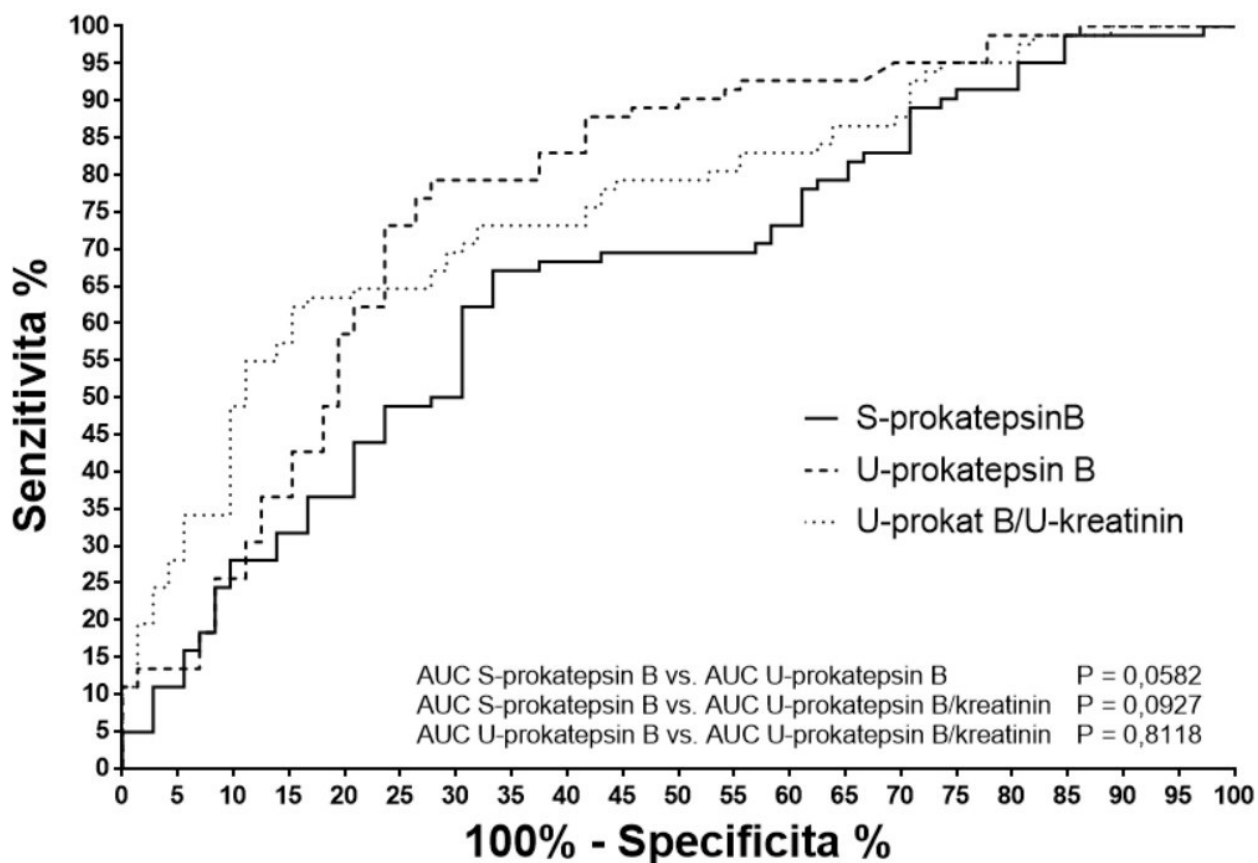
Obrázek 23 – Porovnání diagnostické efektivity katepsinu B v séru a v moči.

Diagnosticky efektivnější pro nádor močového měchýře je prokatepsin B v moči (AUC = 0,77), u séra dosahoval nižší efektivity (AUC = 0,66), shrnuto v tabulce 17. Grafické srovnání diagnostické efektivity pomocí ROC křivek je znázorněno na obrázku 24.

Tabulka 17 – Porovnání diagnostické efektivity prokatepsinu B v séru a v moči.

| Název | AUC (95% interval spolehlivosti) |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| S-prokatepsin B (μg/l) | 0,66 (0,58 – 0,75) |
| U-prokatepsin B (μg/l) | 0,77 (0,70 – 0,85) |
| U-prokatepsin B/U-kreatinin (μg/mmol) | 0,76 (0,69 – 0,84) |

S- sérum, U- moč.



Obrázek 24 – Porovnání diagnostické efektivity prokatepsinu B v séru a v moči.

Srovnání hodnot AUC katepsinu B v moči, séru a poměru katepsinu B na kreatinin se významně statisticky neliší i přes rozdílné hodnoty AUC. Podobně je tomu i při srovnání hodnot AUC u prokatepsinu B (viz obrázek 23, 24). Naproti tomu při srovnání hodnot AUC katepsinu B s prokatepsinem B v séru, moči i poměru katepsinů B na kreatinin je prokatepsin B diagnosticky efektivnější oproti katepsinu B (viz tabulka 18).

Tabulka 18 – Porovnání diagnostické efektivity katepsinu B a prokatepsinu B.

| Název | Hodnota P |
|--|--------------------|
| | P < 0,05 |
| AUC (S-katepsin B) vs. AUC (S-prokatepsin B) | 0,0223 |
| AUC (U-katepsin B) vs. AUC (U-prokatepsin B) | 0,0297 |
| AUC (U-katepsin B/kreatinin) vs. AUC (U-prokatepsin B/kreatinin) | 0,0406 |

S- sérum, U- moč.

9 Diskuze

Cílem této práce bylo stanovení koncentrací aktivní a neaktivní formy katepsinu B v séru a v moči u pacientů s karcinomem močového měchýře. Získané výsledky byly použity k porovnání diagnostické účinnosti analytických metod, které by mohly být využitelné pro rutinní diagnostiku pacientů s karcinomem močového měchýře. V současné době se stále ve většině případů využívají invazivní metody, proto se hledá vhodný biomarker, který by ušetřil čas a byl specifický k danému typu nádoru. Vztah mezi koncentrací katepsinu B v aktivní i neaktivní formě u zdravých jedinců a pacientů lze využít v několika směrech. Jednak lze katepsin B využít pro identifikaci primárních nádorů, dále by mohl být vhodný pro monitoring pacientů s recidivou nádoru či screening rizikových skupin jedinců. Zvýšená exprese katepsinu B byla nalezena u různých nádorových onemocnění (tumory prsu, plic, prostaty, atd.)⁴. Katepsin B může usnadňovat nádorovou progresi několika způsoby, mezi které patří přímá degradace membrán a extracelulární matrix či nepřímo aktivací dalších proteas nebo degradací jejich inhibitorů. U řady nádorových onemocnění byla shledána pozitivní korelace katepsinu B s invazí a metastázemi těchto tumorů. Dosud však bylo publikováno pouze málo studií zabývajících se problematikou katepsinu B jako potenciálního nádorového markeru močového měchýře²⁷.

Naměřené hodnoty katepsinu B v séru dosahovaly u pacientů vyšších hodnot než u kontrolních vzorků, ale nebyly statisticky významné ($P = 0,7$). Naměřené hodnoty katepsinu B v moči u pacientů byly zvýšené oproti kontrolní skupině ($P = 0,01$), stejně tak byly zvýšené hodnoty u pacientů u poměru katepsinu B na kreatinin ($P = 0,01$). Tyto výsledky korelují s výskytem karcinomu močového měchýře a shodují se studií, která uvádí významnou závislost invazivity a diferenciaci karcinomu močového měchýře ($P = 0,0002$)⁴⁶. Naopak práce zaměřená na výzkum katepsinů B, L a H uvádí, že katepsin B ani H v moči nemají žádnou souvislost s invazí nádoru močového měchýře ($P = 0,2$), ale pouze katepsin L vykazoval aktivitu v nádorové tkáni⁵³. Výsledky mohou být také ovlivněny nedostatečným množstvím naměřených vzorků a širokým rozptylem naměřených hodnot.

Zvýšené hodnoty koncentrací katepsinu B v séru mohou být způsobeny vysokým stupněm angioinvazivity, která je spojována s metastázami v lymfatických uzlinách a v pletenci pánevním se vzdálenými metastázami do plic, jater, kostí, krku a centrální nervové soustavy. Při vysokém stupni angioinvazivity dochází k zvýšenému přenosu katepsinu B cévní stěnou, což vede k zvýšeným hodnotám katepsinu B v séru⁴. Studie zabývajících se

karcinomem tlustého střeva ukazuje, že zvýšená koncentrace katepsinu B je asociována spíše s highgrade tumory a horším stavem pacientů a jejich kratší dobou přežití⁵⁴. Na druhé straně však existuje studie, která ukazuje spíše zvýšené hodnoty koncentrace katepsinu B v séru u lowgrade tumorů⁵⁵. Koncentrace katepsinu B v séru může být také ovlivněna přítomností jeho inhibitorů (cystatiny, stefiny a kinogeny) v séru, které snižují jeho aktivitu⁵⁴. Inhibitory se mohou vázat na vazebná místa antigenu, a tím ovlivnit stanovení koncentrace katepsinu B či je stéricky bránit.

Výsledné hodnoty koncentrací katepsinu B v moči se zdají být diagnosticky vhodnější z důvodu přímého kontaktu epitelálních buněk močového měchýře. Z epitelálních nádorových buněk močového měchýře se může katepsin B uvolňovat přímo do moči, čímž by se mohl eliminovat vliv dalších faktorů, které by ovlivňovaly výslednou koncentraci katepsinu B v moči u pacientů s karcinomem močového měchýře.

Katepsin B a prokatepsin B se řadí mezi proteiny, které jsou secernovány do moči při řadě maligních onemocnění, což může být také podpořeno zvýšenou glomerulární filtrací. Podle jedné studie může být koncentrace katepsinu B zvýšená jednak glomerulární filtrací, na druhé straně však může být příčinou zvýšených hodnot v moči i poškození zpětné reabsorpce katepsinu B proximálním tubulem ledvin do lysosomů⁵⁶. Koncentrace katepsinů B je závislá především na diuréze. K eliminování vlivu diurézy bylo využito korekce hodnot koncentrací katepsinu B a prokatepsinu B na kreatinin⁴⁶.

Koncentrace prokatepsinu B u pacientů jsou zvýšené oproti kontrolní skupině. Výrazně zvýšené jsou výsledné hodnoty pro koncentrace prokatepsinu B v moči ($P < 0,0001$), poměru U-prokatepsinu B/U-kreatininu ($P < 0,0001$) a hodnoty koncentrací naměřených v séru ($P = 0,0005$). Zvýšené hodnoty prokatepsinu B v séru u pacientů oproti kontrolní skupině ($P = 0,001$) byly sledovány také studií zabývajících se nádory vaječnicků. Tato studie poukazuje na důležitou roli proenzymů u pacientů s nádorovými onemocněními a prokatepsin B ukazuje jako vhodný biomarker nádoru vaječnicků⁵⁷.

Metody pro stanovení katepsinu B a prokatepsinu B se liší v několika směrech. Především se odlišují v uspořádání sendvičového komplexu. Metoda pro prokatepsin B využívá přímo vázaný konjugát na prokatepsin B, kdežto u metody pro katepsin B se nejprve váže na katepsin B primární protilátka s biotinem, na kterou se následně váže avidin konjugovaný s peroxidasou. Metoda pro katepsin B by mohla být více specifická z důvodu složitějšího sendvičového komplexu. Na druhou stranu je možné dopustit se většího množství

chyb při měření. Dále se metody odlišují teplotou při inkubaci. Metoda pro katepsin B využívá inkubaci při 37 °C, naproti tomu metoda pro katepsin B má inkubační teplotu 2 – 8 °C a po přidání substrátu využívá pokojové teploty. Vzhledem k teplotám inkubace bude reakce katepsinu B s antigeny probíhat rychleji, avšak při dlouhých časových intervalech inkubačních dob, nejspíše rychlost reakce nebude ovlivňovat výslednou koncentraci analytů.

Diagnostická efektivita katepsinu B u karcinomu močového měchýře dosahuje lepších výsledků u stanovení katepsinu B v moči (AUC = 0,6) a poměru katepsinu B na kreatinin (AUC = 0,6) oproti diagnostické efektivitě katepsinu B v séru (AUC = 0,5). Stejně tak je diagnostická účinnost u prokatepsinu B zřetelně lepší u stanovení prokatepsinu B v moči (AUC = 0,8) a poměru prokatepsinu B na kreatinin (AUC = 0,8) než u výsledků v séru (AUC = 0,7). Rozdílné hodnoty AUC u katepsinu B v séru a v moči nejsou statisticky významné ($P = 0,1$), podobně i při srovnání hodnot AUC katepsinu B v séru a poměru katepsinu B na kreatinin ($P = 1,0$). U prokatepsinu B v porovnání hodnot AUC v séru s hodnotami v moči a poměru prokatepsinu B na kreatinin nebyly shledány statisticky rozdílné hodnoty ($P = 0,06$ a $P = 0,09$) i přes rozdílné hodnoty AUC. Statisticky významné rozdíly mezi katepsinem B a prokatepsinem B byly shledány v séru ($P = 0,02$), v moči ($P = 0,03$) a poměru na kreatinin ($P = 0,04$), kdy prokatepsin B se jevil jako diagnosticky efektivnější. Na ROC křivkách je vidět, že i přes rozdílné hodnoty katepsinu B a prokatepsinu B u stanovení v moči a jejich poměru na kreatinin, vykazují ROC křivky podobný charakter. Nerovnoměrný charakter ROC křivky pro katepsin B v séru poukazuje na velkou variabilitu rozptylu hodnot vzorků. Nejlepší diagnostickou efektivitu můžeme pozorovat u prokatepsinu B v moči a jeho poměru na kreatinin, kdy se ROC křivky velmi shodují a dosahují hodnot AUC > 0,75, což svědčí o dobrých diagnosticky efektivních výsledcích.

Výsledné hodnoty katepsinu B v séru naznačují, s porovnáním i s jinými studii^{27,46,54,58}, že aktivita katepsinu B u pacientů s nádorovými onemocněními záleží na spoustě okolností. Koncentrace v séru jsou ovlivněny diferenciací a invazivitou nádoru, působením inhibitorů a mohly by být ovlivněny i poměrem katepsinu B v aktivní či neaktivní formě při různých nádorových onemocněních. Proto stanovení katepsinu B v séru není jednoznačné a bylo by nejspíše potřeba vyššího množství vzorků pro odhalení plné souvislosti pacientů s karcinomem močového měchýře a zdravých jedinců. Výsledky u prokatepsinu B korelovaly s výskytem karcinomu močového měchýře, prozatím však nebylo publikováno jen malé množství studií zabývajících se prokatepsinem B při nádorových onemocněních. V této práci se jeví prokatepsin B jako vhodný biomarker karcinomu močového měchýře.

Výsledky získané v této práci, však mohou být ovlivněny několika faktory. Mezi tyto faktory patří nedostatečné množství měřených vzorků, které by vylučovaly náhodný výskyt extrémních hodnot. Kontrolní skupina se skládala z mladších jedinců, než byla skupina pacientů a nelze vyloučit, že s věkem se nemění hodnoty katepsinu B. Dále nelze vyloučit rozdíl hodnot katepsinu B mezi muži a ženy a ovlivnění tak výsledků jejich nerovnoměrným rozložením u skupiny pacientů a kontrolní skupiny.

10 Závěr

Enzymatické stanovení koncentrace katepsinu B v moči i hodnoty poměru katepsinu B na kreatinin byly zvýšené u pacientů s karcinomem močového měchýře oproti kontrolní skupině. Koncentrace katepsinu B v séru nebyly u pacientů zvýšené. Naměřené hodnoty koncentrací pro katepsin B byly zvýšené u pacientů v moči i séru oproti kontrolní skupině.

Pro stanovení přítomnosti karcinomu močového měchýře se jeví vhodné metody stanovení koncentrací katepsinu B a prokatepsinu B v moči a jejich poměr na kreatin. Diagnosticky nejvýhodnější se jeví stanovení prokatepsinu B v moči, který velmi dobře koreluje s výskytem karcinomu močového měchýře. Katepsin B v aktivní i neaktivní formě je při stanovení koncentrace v moči vhodným markerem pro diagnostiku karcinomu močového měchýře.

Diagnosticky nejefektivnějším markerem pro stanovení karcinomu močového měchýře se jeví prokatepsin B v moči.

Seznam použité literatury

1. WHO. [online]. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> [18/03/2015].
2. Linkos. [online]. <<http://www.linkos.cz/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>> [18/03/2015].
3. Chavan, S., Bray, F., Lortet-Tieulent, J., Goodman, M. & Jemal, A. International variations in bladder cancer incidence and mortality. *Eur. Urol.* 66, 59–73 (2014). ISSN:18737560.
4. Vaňková, V. Stanovení koncentrace katepsinu B u pacientů s karcinomem močového měchýře. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2013. 51 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Karel Kotaška, Ph.D.
5. Guha, S. & Padh, H. Cathepsins: Fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian J. Biochem. Biophys.* 45, 75–90 (2008). ISSN:03011208.
6. Turk, V., Turk, B. & Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities. *EMBO J.* 20, 4629–4633 (2001). ISSN:02614189.
7. Turk, V. *et al.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 68–88 (2012). ISSN:15709639.
8. Novinec, M., Lenarčič, B. & Turk, B. Cysteine Cathepsin Activity Regulation by Glycosaminoglycans. *BioMed Res. Int* 2014, (2014). ISSN:1538-7445.
9. Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K. & Jordans, S. Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 90, 194–207 (2008). ISSN:03009084.
10. Horn, M., Jílková, A. & Mareš, M. Katepsinové proteasy v patologii. *Chem. List.* 108, 358–363 (2014). ISSN:0009-2770.
11. Fonović, M. & Turk, B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 2560–2570 (2014). ISSN:18728006.
12. Cygler, M. *et al.* Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure* 4, 405–416 (1996). ISSN:09692126.
13. Beynon, R. & Bond, J. *Proteolytic Enzymes.* Oxford University Press (2001). Second ISBN:199636621.
14. Turk, B., Turk, D. & Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1477, 98–111 (2000). ISSN:01674838.
15. Yan, S. & Sloane, B. F. Molecular regulation of human cathepsin B: Implication in pathologies. *Biological Chemistry* 384, 845–854 (2003). ISSN:14316730.

16. Reiser, J., Adair, B. & Reinheckel, T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Invest.* 120, 3421–3431 (2010). ISSN:00219738.
17. Turk, V. & Vitale, L. *Proteinases and Their Inhibitors: Structure, Function and Applied Aspects.* (1981). ISBN:0080273777.
18. Baricos, W. H., Zhou, Y., Mason, R. W. & Barrett, a J. Human kidney cathepsins B and L. Characterization and potential role in degradation of glomerular basement membrane. *Biochem. J.* 252, 301–304 (1988). ISSN:0085-2538.
19. Wen, L. *Subcloning and Expression of Functional Human Cathepsin B and K in E. coli : Characterization and Inhibition by Flavonoids.* (2010). ISBN:978-953-307-398-9.
20. Gondi, C. S. & Rao, J. S. Cathepsin B as a Cancer Target. *Expert Opin. Ther. Targets* 29, 997–1003 (2013). ISSN:15378276.
21. Hooka, G., Jin Yu, Toneff, T., Kindy, M. & Hook, V. Brain Pyroglutamate Amyloid-Beta is Produced by Cathepsin B and is Reduced by the Cysteine Protease Inhibitor E64d, Representing a Potential Alzheimer's Disease Therapeutic. *J. Alzheimers Dis.* 41, 129–149 (2014). ISSN:15378276.
22. Sun, B. *et al.* Cystatin C–Cathepsin B Axis Regulates Amyloid Beta Levels and Associated Neuronal Deficits in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *October* 60, 247–257 (2009). ISSN:0896-6273.
23. Li, Z. *et al.* Regulation of Collagenase Activities of Human Cathepsins by Glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 279, 5470–5479 (2004). ISSN:00219258.
24. Wang, C., Sun, B., Zhou, Y., Grubb, A. & Gan, L. Cathepsin B degrades amyloid- β in mice expressing wild-type human amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 287, 39834–39841 (2012). ISSN:1083351X.
25. Liang, Q., Ouyang, X., Schneider, L. & Zhang, J. Reduction of mutant huntingtin accumulation and toxicity by lysosomal cathepsins D and B in neurons. *Mol. Neurodegener.* 6, 37 (2011). ISSN:1750-1326.
26. Turk, V., Turk, B., Gunčar, G., Turk, D. & Kos, J. Lysosomal cathepsins: Structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv. Enzyme Regul.* 42, 285–303 (2002). ISSN:00652571.
27. Eiján, A. M. *et al.* High expression of cathepsin B in transitional bladder carcinoma correlates with tumor invasion. *Cancer* 98, 262–268 (2003). ISSN:0008543X.
28. Mort, J. S. & Buttle, D. J. Molecules IN FOCUS. *Int. J. Biochem. cell Biol.* 29, 715–720 (1997). ISSN:13572725.
29. Berquin, I. M., Cao, L., Fong, D. & Sloane, B. F. Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. *Gene* 159, 143–149 (1995). ISSN:03781119.

30. Gocheva, V. & Joyce, J. a. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 6, 60–64 (2007). ISSN:15384101.
31. Turk, V., Kos, J. & Turk, B. Cysteine cathepsins (proteases) - On the main stage of cancer? *Cancer Cell* 5, 409–410 (2004). ISSN:15356108.
32. Mohamed, M. M. & Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 764–775 (2006). ISSN:1474-175X.
33. Lampe, C. M. & Gondi, C. S. Cathepsin B Inhibitors for Targeted Cancer Therapy. *J. Cancer Sci. Ther.* 06, 417–421 (2014). ISSN:19485956.
34. Vasiljeva, O. *et al.* Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Des.* 13, 387–403 (2007). ISSN:13816128.
35. Nissinen, L. & Kähäri, V. M. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 2571–2580 (2014). ISSN:18728006.
36. Kobayashi, H. *et al.* Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J. Biol. Chem.* 266, 5147–5152 (1991). ISSN:00219258.
37. Budihna, M. *et al.* Prognostic Significance of Cysteine Proteinases Cathepsins B and L and Their Endogenous Inhibitors Stefins A and B in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin. Cancer Res.* 6, 1052–1062 (2000). ISSN:1557-3265.
38. Foghsgaard, L. *et al.* Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* 153, 999–1010 (2001). ISSN:0021-9525.
39. Lakka, S. S. *et al.* Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 23, 4681–4689 (2004). ISSN:0950-9232.
40. Cheng, L. *et al.* Biomarkers in bladder cancer: Translational and clinical implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 89, 73–111 (2014). ISSN:10408428.
41. Castillo-Martin, M., Domingo-Domenech, J., Karni-Schmidt, O., Matos, T. & Cordon-Cardo, C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 28, 401–408 (2010). ISSN:10781439.
42. Kiriluk, K. J., Prasad, S. M., Patel, A. R., Steinberg, G. D. & Smith, N. D. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 30, 199–211 (2012). ISSN:10781439.
43. Smith, Z. L. & Guzzo, T. J. Urinary markers for bladder cancer. *EAU Updat. Ser.* 1, 64–70 (2003). ISSN:15709124.

44. Sharma, S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* 30, 1–8 (2009). ISSN:0975-2129.
45. Lokeshwar, V. B. *et al.* Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 66, 35–63 (2005). ISSN:00904295.
46. Kotaska, K., Dusek, P., Prusa, R., Vesely, S. & Babjuk, M. Urine and Serum Cathepsin B Concentrations in the Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *J. Clin. Lab. Anal.* 26, 61–65 (2012). ISSN:08878013.
47. Chen, L. *et al.* Hsp74 , a Potential Bladder Cancer Marker , Has Direct Interaction with Keratin 1. *J. immunology Reaserch* 2014, 1–7 (2014). ISSN:2314-8861.
48. Gan, S. D. & Patel, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Invest. Dermatol.* 133, e12 (2013). ISSN:1523-1747.
49. Crowther, J. R. The ELISA guidebook. *Methods Mol. Biol.* 149, III–IV, 1–413 (2000). ISSN:0006-2979.
50. Cloud-Clone Corporation. Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Cathepsin B. (2013). [online]. <<http://www.cloud-clone.us/include/search/uscn.php>> [11/06/2015].
51. The Quantikine Human Pro-Cathepsin B Immunoassay. [online]. <<http://www.rndsystems.com/pdf/dcatb0.pdf>> [11/06/2015].
52. Kotaška, K., Jedličková, B. & Průša, R. Je stanovení sérového kreatininu vždy věrohodné ? Úskalí preanalytické fáze. *Cas. Lek. Cesk.* 7, 392–395 (2008). ISSN:00087335.
53. Staack, A. *et al.* Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 63, 1089–1094 (2004). ISSN:00904295.
54. Kos, J. *et al.* Prognostic values of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 4, 1511–1516 (1998). ISSN:1078-0432.
55. Sheahan, K., Shuja, S. & Murnane, M. J. Cysteine Protease Activities and Tumor Development in Human Colorectal Carcinoma. *Cancer Res.* 3809–3814 (1989). ISSN:1817-4256.
56. Nielsen, R. *et al.* Endocytosis provides a major alternative pathway for lysosomal biogenesis in kidney proximal tubular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5407–5412 (2007). ISSN:0027-8424.
57. Gashenko, E. a. *et al.* Evaluation of serum procathepsin B, cystatin B and cystatin C as possible biomarkers of ovarian cancer. *Int. J. Circumpolar Health* 72, 1–5 (2013). ISSN:12399736.

58. Svatek, R. S. *et al.* Role of urinary cathepsin B and L in the detection of bladder urothelial cell carcinoma. *J. Urol.* 179, 478–484 (2008). ISSN:00225347.