

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie

Veronika Vaňková

**Stanovení koncentrace katepsinu B
u pacientů s karcinomem močového měchýře**

Bakalářská práce

Praha 2013

Autor práce: **Veronika Vaňková**

Vedoucí práce: **Ing. Karel Kotaška, Ph.D.**

Oponent práce: **Ing. Eva Klapková, Ph.D.**

Datum obhajoby: **2013**

Bibliografický záznam

VAŇKOVÁ, Veronika. *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.

Anotace

Předložená práce byla zaměřena na stanovení koncentrace katepsinu B v moči a v séru u pacientů s karcinomem močového měchýře s cílem posoudit možnost využití koncentrací katepsinu B, k určení míry diferenciaci a invazivity nádoru.

Koncentrace katepsinu B byly stanoveny prostřednictvím enzymové imunoanalýzy. Byl vyšetřen i poměr katepsinu B na kreatinin v moči. Kreatinin byl stanoven enzymatickou kreatinázovou metodou.

Bylo vyšetřeno 48 pacientů (32 mužů, 16 žen), jejichž průměrný věk byl 66,5 let. Pacienti byli rozděleni do skupin podle diferenciaci (low grading: 11 pacientů, high grading: 37 pacientů) a invazivity (neinvazivní nádory: 19 pacientů, invazivní nádory: 29 pacientů). Kontrolní skupinu tvořilo 30 zdravých jedinců (13 mužů, 17 žen, průměrný věk 59 let).

Prokázali jsme zvýšené koncentrace katepsinu B v moči ve skupině pacientů s karcinomem močového měchýře oproti kontrolní skupině (medián = 1.48 $\mu\text{g/l}$ vs. 6.42 $\mu\text{g/l}$, $P < 0.0001$). Zvýšená koncentrace byla stanovena i v poměru katepsinu B na kreatinin v moči (medián = 0.20 $\mu\text{g/l}$ vs. 0.83 $\mu\text{g/l}$, $P < 0.0001$). Koncentrace katepsinu B v séru se v obou skupinách významně nelišily (medián = 75.52 $\mu\text{g/l}$ vs. 81.15 $\mu\text{g/l}$, $P = 0.9057$).

Koncentrace katepsinu B v moči a poměr katepsinu B na kreatinin v moči mohou být významným diagnostickým ukazatelem u pacientů s karcinomem močového měchýře.

Klíčová slova

Karcinom močového měchýře; Močový měchýř; Katepsin B; Invazivní nádory, Neinvazivní nádory; Diferencované nádory, Nediferencované nádory

Annotation

The aim of this work has been to assess the concentration of cathepsin B in the urine and in the serum of patients with transitional cell carcinoma and to evaluate the relation of cathepsin B in tumour differentiation and invasivity.

The Concentrations of cathepsin B in serum and urine were measured by means of an enzymatic immunoassay. The ratio of cathepsin B and of creatinine in the urine were also examined. Creatinine was measured by the enzymatic creatinase method.

48 patients were examined (32 men, 16 women) whose average age was 66,5 years. The patients were divided into groups according to the grading (low grading: 11 patients, high grading: 37 patients) and the invasivity tumours (nonmuscle-invasive tumours: 19 patients, invasive tumours: 29 patients). The Control group was formed by 30 healthy subjects (13 men, 17 women, average age 59 years).

We proved a higher concentration of cathepsin B in the urine in the group of the patients with tumours of the bladder tissue (Median = 1.48 $\mu\text{g/l}$ vs. 6.42 $\mu\text{g/l}$, $P < 0.0001$). The higher concentration was also proved in the ratio of cathepsin B and of creatinine in the urine (Median = 0.20 $\mu\text{g/l}$ vs. 0.83 $\mu\text{g/l}$, $P < 0.0001$). The concentration of cathepsin B in the serum wasn't significantly different in both groups (Median = 75.52 $\mu\text{g/l}$ vs. 81.15 $\mu\text{g/l}$, $P = 0.9057$).

The concentration of cathepsin B in the urine and the ratio of cathepsin B and creatinine in the urine can be a significant diagnostic marker in the patients having a tumour of the urinary bladder.

Keywords

Transitional cell carcinoma; Bladder; Cathepsin B; Invasive tumour; Noninvasive tumour; Grading

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Karla Kotašky, Ph.D., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 23. 4. 2013

.....

Veronika Vaňková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Karlovi Kotaškovi, Ph.D. za trpělivé vedení mé bakalářské práce, za čas i odborné rady a pomoc při řešení problémů. Dále děkuji Pavle Kubešové, Radce Matějové a všem studentům a zaměstnancům Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie za pomoc a vytvoření příjemných podmínek při práci v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přáteli. Bez jejich podpory by tato práce nevznikla.

Obsah

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD..... | 9 |
| 1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY..... | 10 |
| 1.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE O NÁDORECH..... | 10 |
| 1.2 PŘÍČINY VZNIKU NÁDORŮ | 10 |
| 1.3 VZNIK A VLASTNOSTI NÁDORŮ | 11 |
| 1.4 ROZDĚLENÍ NÁDORŮ PODLE BIOLOGICKÉ POVAHY..... | 12 |
| 1.5 CHARAKTERIZACE NÁDORU | 13 |
| 1.5.1 Klasifikace nádorů – TNM klasifikace..... | 14 |
| 1.6 NÁDORY MOČOVÉHO MĚCHÝŘE | 16 |
| 1.6.1 Epidemiologie nádoru močového měchýře a etiologické faktory..... | 17 |
| 1.6.2 Symptomatologie nádoru močového měchýře | 17 |
| 1.6.3 Diagnostika nádoru močového měchýře..... | 18 |
| 1.6.4 Laboratorní stanovení a zobrazovací metody..... | 18 |
| 1.6.5 Prognóza, prevence a léčba..... | 18 |
| 1.6.6 Mechanismus tumorigeneze uroteliálního karcinomu močového měchýře | 19 |
| 1.7 PŘEHLED DALŠÍCH NÁDOROVÝCH MARKERŮ U KARCINOMU MOČOVÉHO MĚCHÝŘE | 20 |
| 1.8 BIOCHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA KATEPSINŮ..... | 22 |
| 1.8.1 Katepsin B..... | 24 |
| 1.8.2 Katepsin B v patologických stavech..... | 25 |
| 1.8.3 Gen pro katepsin B..... | 26 |
| 2 CÍLE PRÁCE..... | 28 |
| 3 MATERIÁL, METODY A PŘÍSTROJE | 29 |
| 3.1 REAGENČNÍ SOUPRAVA QUANTIKINE ELISA NA STANOVENÍ KATEPSINU B | 29 |
| 3.1.1 Reagencie..... | 29 |
| 3.2 PRINCIP ENZYMOVÉ IMUNOANALÝZY..... | 30 |
| 3.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ..... | 31 |
| 3.4 PRACOVNÍ POSTUP PRO THE QUANTIKINE HUMAN PRO-CATHEPSIN B IMMUNOASSAY | 32 |
| 3.5 STANOVENÍ KREATININU..... | 35 |

| | | |
|----------|---------------------------------------|-----------|
| 3.6 | STATISTICKÁ ANALÝZA..... | 35 |
| 4 | PACIENTI..... | 36 |
| 4.1 | CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ..... | 36 |
| 5 | VÝSLEDKY | 39 |
| 6 | DISKUZE..... | 41 |
| 7 | ZÁVĚR..... | 44 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 45 |
| 9 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 48 |

ÚVOD

Nádorová onemocnění patří mezi nejčastější příčiny úmrtí, proto je nutné jejich diagnostice věnovat zvýšenou pozornost. Metody využívané pro diagnostiku nádorového onemocnění často zahrnují invazivní postupy (např. biopsie), které výrazným způsobem zatěžují pacienta. Moderní medicína se proto obrací především k neinvazivním metodám zahrnujícím laboratorní analýzu specifických markerů. Tato vyšetření jsou upřednostňována především proto, že během krátkého časového úseku může být změřeno hned několik parametrů najednou a podle jednotlivých výsledků je pak možné určit celkový aktuální zdravotní stav pacienta. Tímto způsobem lze sledovat takové odchylky od normálního stavu, které ještě pacient nemusí vnímat. Laboratorní vyšetření pomáhají při prevenci a včasném odhalení řady civilizačních chorob, ale i onkologických chorob v raném stádiu. Pro monitorování průběhu onkologických onemocnění se používají tumorové markery. Jejich stanovení je sice poměrně finančně nákladné oproti jiným laboratorním metodám vyšetření, avšak pacient není vystavován takové fyzické i psychické zátěži, jako kdyby byla při každé návštěvě pacienta prováděna biopsie. Laboratorní diagnostika nádorového onemocnění umožňuje propojení dalších oborů (genetika, patologie, urologie), a tím lepší diagnostiku nádorového onemocnění. Ve své bakalářské práci se věnuji stanovení katepsinu B u pacientů s karcinomem močového měchýře.

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Základní informace o nádorech

Nádorová onemocnění jsou hned po kardiovaskulárních onemocnění druhou nejčastější příčinou úmrtí u dospělých jedinců.

Nádor lze definovat jako novotvar - neoplazma, nebo-li *de novo* vytvořená masa tkáně, jejíž růst přesahuje anatomické i funkční potřeby tkáně normální. Tento růst pokračuje i poté, co příčiny vyvolávající nádorové bujení přestaly působit. Nádorová tkáň postrádá diferencované mikroskopické i makroskopické uspořádání normální tkáně a po funkční stránce se nepodílí na fyziologické činnosti buněk.

Velmi důležité pro správnou diagnostiku onemocnění je správně klasifikovat nádory pomocí histopatologických metod. Tyto metody jsou prováděny v rámci oboru patologie, která se studiem nádorů přímo zabývá. Patologie se zabývá především makroskopickou, mikroskopickou, imunohistochemickou a molekulární diagnostikou nádorových onemocnění [1, str. 133].

1.2 Příčiny vzniku nádorů

Je známo mnoho příčin, které se podílejí na vzniku nádoru. Mezi některé známé příčiny vzniku nádorů patří:

- kancerogeny (chemické látky zevního prostředí),
- viry,
- hormony,
- genetické vlivy (dědičnost),
- dietetické návyky (druh potravy, způsob přípravy potravin, konzumace)
- vliv prostředí.

Kancerogeny mohou v buňkách vyvolat změny, které v konečném důsledku vedou ke vzniku nádoru. Někdy může vzniknout nádor v organismu při setkání s nízkou dávkou, jindy je pro vznik nádoru nutná dlouhodobá opakovaná expozice. Jedná se převážně o chemické látky, které jsou například přítomné v dehtu, dále aromatické uhlovodíky, vinylchlorid používaný při výrobě plastických hmot, nebo aflatoxiny přítomné v obilninách. Dlouhodobá expozice cigaretovému kouři je taktéž škodlivá [2].

Další možnou příčinou vzniku zhoubných nádorů je krátkovlnné záření, například rentgenové záření. Sluneční ultrafialové záření může vést ke vzniku kožních nádorů, tzv. melanomů. Mezi další významné kancerogeny patří plyny (radon), některé viry (např. EBV, známý jako původce infekční mononukleózy, může se však také podílet na vzniku Burkittova lymfomu), dále herpesviry a papilomaviry.

Rizikové faktory pro vznik nádorového onemocnění jsou také věk, v období klimakteria, může docházet ke zvýšení hladiny estrogenů a s tím spojeným rizikům vzniku karcinomu prsu a endometria.

Dalšími faktory jsou faktory genetické a dietetické. U dietetických faktorů se poukazuje na rozdíly v kvalitě potravy v různých oblastech světa i mezi obyvateli jedné země. Obzvláště se jako prevence vzniku nádoru doporučuje dostatek vlákniny v potravě [2].

1.3 Vznik a vlastnosti nádorů

Na vzniku nádorových onemocnění se podílejí genetické změny a změny v regulačních mechanismech buněčných cyklů, díky nimž dochází k funkční deregulaci dělení buňky a apoptóze. Genetické změny se mohou vytvořit:

- během života přímo ve tkáni nebo v orgánu, kde vzniká nádor takzvanými sporadickými mutacemi,
- při vrozené mutaci klíčových genů ovlivňujících chod buněk takzvanými mutacemi v zárodečné linii.

Mezi oběma výše uvedenými mechanismy vzniku nádorů jsou zásadní rozdíly. Sporadické mutace postihují pouze buňky, ze kterých nádor vzniká. Mutace v zárodečné linii oproti tomu postihují všechny buňky v těle nemocného s nádorem. Tato mutace je totiž zakotvena embryonálním přenosem od jednoho z rodičů, nebo může vzniknout *de novo* v zárodečných buňkách po oplodnění [1, 2].

Důležitou vlastností nádorových buněk je schopnost pokračovat v replikaci nezávisle na regulačních vlivech, které kontrolují přirozenou regeneraci buněk a jejich růst. Nádory získávají určitý stupeň nezávislosti (autonomie) na orgánu nebo tkáni v místě svého vzniku, nebo v místech metastatického rozsevu nádoru. Hostitel nádoru poskytuje prokrvení a výživu. V místě vzniku nádoru není přes určitý stupeň autonomie nádorová populace absolutně nezávislá na celkových a místních regulačních vlivech.

Růst nádoru mohou podporovat například hormonální vlivy probíhající v organismu, růstové faktory i regulační vlivy buněk stromatu. Naopak regulační vlivy brzdící rozvoj nádoru mohou nádor pozastavit v růstu. Všechny nádory mají dvě základní složky:

- nádorový parenchym,
- stroma nádoru.

Nádorový parenchym určuje biologické chování nádoru a je vlastní nádorovou tkání, která by však nemohla existovat bez podpory stromatu. Stroma není jen pasivní podpora, na které by nádor rostl, ale přináší i výživu a růstově regulační prvky ovlivňující nádorový parenchym. Stroma je tvořena cévami, pojivovou tkání, popřípadě zánětlivými buňkami hostitele. Mezi buňkami parenchymu a stromatu probíhá molekulární komunikace, která buď brzdí, nebo podporuje růst nádoru a jeho další vývoj.

Nádory ve většině případů považujeme za monoklonální onemocnění. Většina nádorů se vytváří z jedné jediné buňky, ve které došlo ke změnám umožňující její deregulovanou proliferaci do buněk dceřiných a následně do dalších generací nádorových buněk. Předpokládáme, že nádorová populace obsahuje kmenové buňky, které mají schopnost zahájit nádorový růst a udržet jej [1, 2].

1.4 Rozdělení nádorů podle biologické povahy

Nádory můžeme rozdělit podle jejich biologické povahy a následného potencionálního vývoje na:

- benigní nádory,
- maligní nádory.

Za benigní nádory označujeme takové nádory, které rostou v místě svého vzniku, jsou ohraničené nebo opouzdřené a nemají tendenci k metastazování. Zpravidla je lze chirurgicky odstranit a neměly by svému hostiteli působit závažnější poruchy. Ale jsou známy i výjimky, kdy například benigní nádory z B-buněk Langerhansových ostrůvků mohou za nadprodukce inzulínu způsobit hypoglykémii [1].

Maligní nádory nejsou ohraničené, mají tendenci k progresivnímu šíření jak invazivnímu (místnímu) tak i k vzdálenému (metastazujícímu). U maligních nádorů

můžeme ještě určit různé stupně malignity. Je velmi důležité pro následnou péči pacienta rozlišit, zda se jedná o nádor benigní či maligní.

Jsou známy čtyři základní charakteristiky pro rozdělení nádorů a určení malignity:

- podle diferenciacie nádorových buněk a anaplazie,
- podle rychlosti růstu nádoru,
- podle chování vůči tkáním v okolí,
- podle schopnosti zakládání dceřiných ložisek na vzdálených místech - metastáza [1].

1.5 Charakterizace nádoru

Nádory můžeme charakterizovat prostřednictvím třech hlavních ukazatelů: typingu, gradingu a stagingu.

Typing je používán k určení histologického typu nádoru, charakterizuje nádor z morfologického hlediska.

Grading je využíván k určení stupně malignity nádoru a umožňuje stanovit míru invazivity i metastatického potenciálu příslušného nádoru. Zhoubné nádory jsou pak zařazovány do nízkého, středního a vysokého stupně malignity (grade). Grading hodnotí buď diferenciaci nebo proliferační aktivitu.

Grading se rozděluje do čtyř skupin podle stupně histologické zralosti nádorové tkáně na:

- Grade 1 – dobře diferencovaný nádor s tendencí k plné diferenciaci (podobnosti s dospělými buňkami výchozí tkáně) ve více než třech čtvrtinách nádorových buněk,
- Grade 2 – středně diferencovaný nádor má jednu polovinu až tři čtvrtiny buněk diferencovaných,
- Grade 3 – málo diferencovaný nádor má jednu čtvrtinu až jednu polovinu buněk diferencovaných
- Grade 4 – nediferencovaný nádor má méně než jednu čtvrtinu buněk diferencovaných [3].

Staging se používá k určení rozsahu onemocnění, tj. stádia rozvoje nádorového onemocnění v době záchytu a primární diagnostiky. Staging u nádorů je klasifikován podle velikosti primárního nádoru, jeho rozsahu, šíření do regionálních lymfatických uzlin a přítomnosti nebo absenci vzdálených metastáz. Staging může být stanoven pomocí počítačové tomografie, magnetické rezonance, případně pomocí chirurgické revize. Po chirurgickém resekcčním výkonu se stage tumoru doplní a upřesní podle posouzení rozsahu nádoru a postižení lymfatických uzlin patologem. Klinicky má staging větší význam než grading [1, str. 186].

1.5.1 Klasifikace nádorů – TNM klasifikace

V současné době se ke klasifikaci nádorů používá tzv. TNM klasifikace. Je to nejuniverzálnější systém prosazovaný UICC (International Union Against Cancer). Jedná se o klinicko-morfologickou klasifikaci, kde písmeno T (tumor) znamená velikost a rozsah místního šíření nádoru. Nabývá hodnot T1 – T4 dle různé náplně v jednotlivých orgánových lokalizacích. Čím je číslo vyšší, tím větší je jeho místní šíření nebo rozsah nádoru. Písmenem N (node) hodnotíme postižení regionálních uzlin. „N“ nabývá hodnot N1 – N3 podle velikosti a počtu postižených uzlin. Symbol M (metastasis) určuje přítomnost vzdálených nebo alespoň juxtaregionálních metastáz při hodnotě M1, nebo nepřítomnost při M0.

Tento systém slouží k jednoduchému popisu rozsahu nádoru a určení stádia onemocnění viz. tabulky 1 a 2 [4, str. 153].

Tabulka č. 1.: TNM klinická klasifikace [5]

| T Primární nádor | |
|----------------------------------|--|
| TX | primární nádor nelze hodnotit |
| T0 | bez známek primárního nádoru |
| Ta | neinvazivní papilární karcinom |
| Tis | karcinom in situ |
| T1 | nádor postihuje subepiteliální vazivo |
| T2 | nádor postihuje svalovinu |
| T2a | nádor postihuje povrchovou svalovinu (vnitřní polovinu tloušťky) |
| T2b | nádor postihuje hlubokou svalovinu (zevní polovinu tloušťky) |
| T3 | nádor postihuje perivezikální tkáň: |
| T3a | mikroskopicky |
| T3b | makroskopicky (extravezikální masy) |
| T4 | nádor postihuje některou z následujících struktur: stroma prostaty, semenné vajíčky, dělohu, pochvu, stěnu pánevní, stěnu břišní |
| T4a | nádor postihuje stroma prostaty, semenné vajíčky, dělohu nebo pochvu |
| T4b | nádor postihuje pánevní stěnu nebo břišní stěnu |
| N Regionální mízní uzliny | |
| NX | regionální mízní uzliny nelze hodnotit |
| N0 | regionální mízní uzliny bez metastáz |
| N1 | metastáza v jediné mízní uzlině malé pánve (hypogastrické, obturátorové, zevní ilické nebo presakrální) |
| N2 | metastáza ve vícečetných mízních uzlinách malé pánve (hypogastrických, obturátorových, zevních ilických nebo presakrálních) |
| N3 | metastáza ve společné ilické mízní uzlině (uzlinách) |
| M Vzdálené metastázy | |
| MX | vzdálené metastázy nelze hodnotit |
| M0 | bez vzdálených metastáz |
| M1 | vzdálené metastázy |

Tabulka č. 2.: Rozdělení nádoru do stadií při karcinomech [5]

| Rozdělení do stadií | | | |
|----------------------------|-------------|-------------|----|
| Stadium 0a | Ta | N0 | M0 |
| Stadium 0is | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1 | N0 | M0 |
| Stadium II | T2a, T2b | N0 | M0 |
| Stadium III | T3a, T3b | N0 | M0 |
| | T4a | N0 | M0 |
| Stadium IV | T4b | N0 | M0 |
| | jakékoliv T | N1, N2, N3 | M0 |
| | jakékoliv T | jakékoliv N | M1 |

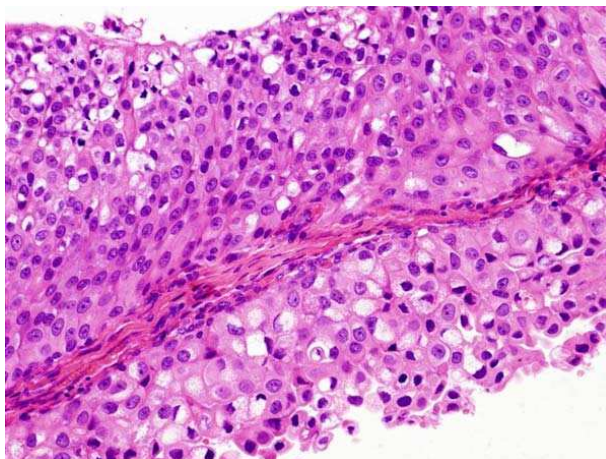
1.6 Nádory močového měchýře

„Naprostou většinu nádorů močového měchýře představují nádory epiteliálního původu. Nejčastějším histologickým typem je uroteliální karcinom (karcinom z přechodného epitelu), který u nás tvoří přes 90 % nádorů, méně častými variantami jsou epidermoidní karcinom a adenokarcinom“ [6, str. 484]. Typický je multifokální výskyt nádoru. Podle hloubky invaze nádoru rozlišujeme:

- povrchové nádory,
- invazivní nádory.

Povrchové nádory se vyskytují v 70 – 80 % případů. Postihují jen sliznici nebo subepiteliální pojivovou tkáň. Tyto nádory můžeme vyléčit pomocí endoskopie, ovšem jejich typickým znakem jsou časté recidivy, které se objevují až u 80 % pacientů. V případě recidivy nádoru může dospět i k progresi, kdy opakovaně vzniklý nádor prostoupí svalovinu detruzoru. Podle typu primárního nádoru toto riziko kolísá mezi 2 - 50 %.

Invazivní nádory se vyskytují ve zbylých 20 – 30 % případů. Tyto nádory infiltruji do svaloviny detruzoru močového měchýře. Invazivní nádory tvoří uzlinové metastázy až v 50 %. Léčba těchto nádorů si žádá agresivnější způsoby, jako jsou různé kombinace radikálních chirurgických výkonů, radioterapie a systémové chemoterapie [2, str. 215].

Obrázek 1. Uroteliální karcinom s prstencitými elementy v povrchovém urotelu [7]

1.6.1 Epidemiologie nádoru močového měchýře a etiologické faktory

Nádory močového měchýře jsou u mužů šestou a u žen třináctou nejčastější malignitou v České republice. Incidence pro Českou republiku se pohybuje u mužů okolo 28 na 100 000 obyvatel a u žen je to 9 na 100 000 obyvatel. Ve všech průmyslových zemích má incidence spíše vzrůstající charakter, mortalita ale zůstává relativně stabilní. Incidence onemocnění stoupá s věkem. Nejvyšší výskyt je u obyvatel okolo 60 let věku. U dětí tyto nádory nalézáme ojediněle [8].

Mezi nejčastější etiologické faktory vzniku nádoru močového měchýře patří kouření. Předpokládá se, že kouření se podílí na vzniku nádoru močového měchýře z 25 až 60 % a tedy riziko vzniku nádoru se u kuřáků zvyšuje zhruba čtyřikrát. Dalším významným faktorem jsou profesní expozice, při kterých je organismus vystavován kancerogenním látkám především ze skupiny aromatických aminů (benzidin, 2-naftylamin, 4-aminobifenyl). Zvýšené riziko vzniku nádoru močového měchýře bylo prokázáno u zaměstnanců tiskařského průmyslu, při výrobě železa i hliníku, barviv a asfaltu. Vyšší nebezpečí vzniku uroteliálního karcinomu může způsobit i aplikace léků, např. cyklofosfamidu. Prokazatelně k jednomu z etiologických faktorů patří i parazitární onemocnění – Schistosomóza (bilharzióza), která se vyskytuje v oblastech severní Afriky a Arabského poloostrova [9].

1.6.2 Symptomatologie nádoru močového měchýře

Celkové subjektivní příznaky nádoru močového měchýře jsou většinou nespecifické. Nejčastějším důvodem návštěvy lékaře je makroskopická hematurie (75 - 80 %), která je většinou bezbolestná a intermitentní. U povrchových nádorů

pacienti obvykle necítí bolest a výjimečně se u nich projevují mikční symptomy, jako jsou bolestivé močení, provázené pálením a řezáním, nebo časté nucené močení, provázené vymočením malého množství moči. Invazivní nádory se projevují častěji mikčními obtížemi. U pokročilých nádorů bývá přítomna bolest v oblasti pánve a obstrukční mikční symptomy. Přibližně u 20 % pacientů je onemocnění, nemající žádné příznaky, zachyceno zcela náhodně [6, 8, 10].

1.6.3 Diagnostika nádoru močového měchýře

U pacientů s podezřením na nádor močového měchýře rutinně provádíme vyšetření, která jsou zařazena do vyšetřovacího programu. Vyšetřovací program můžeme rozdělit do tří základních částí:

1. **stanovení diagnózy** – určení anamnézy, fyzikální vyšetření, vyšetření moči (chemicky, sediment, kultivace, cytologie), vyšetření horních močových cest (vylučovací urografie), endoskopické vyšetření,
2. **potvrzení diagnózy** – k potvrzení dochází pomocí biopsie při endoskopii v narkóze nebo histologickým vyšetřením tkáně získané resekci,
3. **stanovení rozsahu onemocnění** – rozsah je hodnocen pomocí TNM klasifikace. Tento počín je nutný pro vyslovení prognózy a určení následné optimální léčebné terapie [6].

1.6.4 Laboratorní stanovení a zobrazovací metody

Při vyšetření moči bývá obvykle u všech nádorů přítomná mikroskopická hematurie. Proto by měla být hematurie vždy podrobně urologicky vyšetřena. Kromě toho se všem pacientům s podezřením na přítomnost nádoru provádí ultrasonografické vyšetření močového měchýře a ledvin, vylučovací urografie a cytoskopie. Díky nespécifickému charakteru symptomů vyšetřujeme endoskopicky všechna podezření na nádor močového měchýře. Důležitým prebiopickým vyšetřením k průkazu nádorových buněk je onkologická cytologie.

Léčebný postup se řídí stupněm invaze. Povrchové nádory se vyskytují zhruba v 70 % případů a infiltrující nádory asi ve 30 % případů [8].

1.6.5 Prognóza, prevence a léčba

Prognóza onemocnění záleží na stádiu, ve kterém byl nádor diagnostikován. Prognostickými faktory jsou velikost nádoru, stupeň invaze, mnohočetný výskyt,

histologický grade, dysplázie v okolním urotelu a četnost recidiv. Povrchové nádory recidivují přibližně v 60 % případů, u jedné čtvrtiny z nich dochází k progresi. Pětiletého přežití dosahují pacienti zhruba v 90 % případů u povrchového tumoru Ta-T1, G1-2. U povrchového tumoru G3 pak klesá šance na pětileté přežití na 60 % [9, 8].

Lokálně pokročilé infiltrující nádory se liší v šanci na pětileté přežití podle rozsahu lokálního onemocnění. U pT0 - pT2 dosahuje tato šance 70 – 80 %, při extravezikálním šíření se pohybuje kolem 30 %. Při postižení uzlin klesá šance na pětileté přežití pod 20 %. Metastazující nádory mají šanci na pětileté přežití menší než 5 % [10].

Primární prevence vzniku karcinomu močového měchýře zahrnuje především omezení kouření. Ostatní rizikové faktory jsou v dnešní době prakticky eliminovány. Sekundární prevence je založena na pečlivém odborném vyšetření pacientů s mikroskopickou hematurií a symptomy dolních močových cest [10].

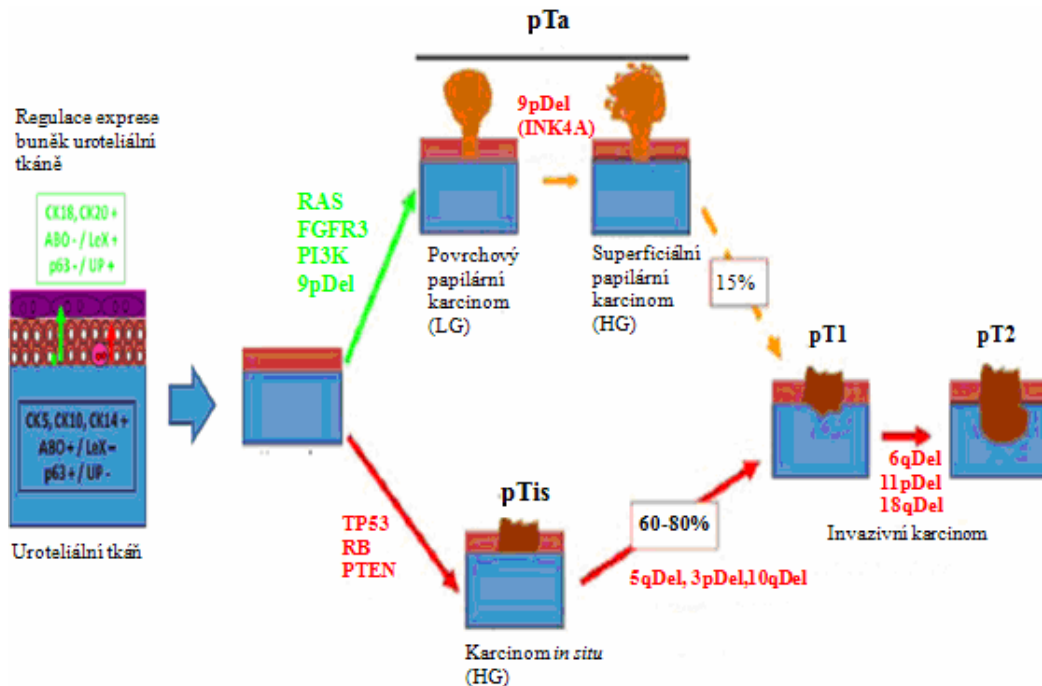
K léčbě může být využito operačních výkonů, jako například transuretrální resekce nádoru (TUR). Po níž většinou následuje zajišťovací léčba chemoterapií. Chemoterapie využívá cytotoxické, pro buňku jedovaté látky, nebo cytostatické látky, které zastavují růst a dělení buněk. K léčbě se může také použít adjuvantní terapie, která má cíl zničit mikrometastázy tak, aby bylo zlepšeno celkové přežití nemocných. Adjuvantní terapii provádíme buď, radioterapií nebo systémovou terapií, tzn. chemoterapií, imunoterapií, biologickou terapií či hormonální terapií.

1.6.6 Mechanismus tumorogeneze uroteliálního karcinomu močového měchýře

Většina zhoubných nádorů rostoucích v močovém měchýři jsou uroteliální karcinomy. Klinicky tvoří povrchové nádory močového měchýře (stadium Ta a Tis) kolem 75 % až 85 % novotvarů, zatímco zbývajících 15 % až 25 % jsou invazivní nádory (stadium T1, T2 - T4) nebo metastatické léze. Invazivní karcinom močového měchýře může vzniknout dvěma odlišnými cestami s různou histopatologickou strukturou, odlišnými molekulárními změnami i klinickými projevy. Schéma vzniku uroteliálního karcinomu je zachyceno na obrázku 2. V první fázi tumorogeneze nejprve dochází k regulaci exprese buněk uroteliální tkáně (především cytokeratiny, protein p63, uroplakin). Následně může za regulace exprese řady genů dojít ke vzniku povrchových málo diferencovaných a diferencovaných papilárních karcinomů (zde se uplatňují např.

mutace v genech H-RAS, FGFR3, PI3K). Za účasti genetických variant v genech pro TP53, RB a PTEN může docházet k tvorbě invazivních tumorů [11].

Obrázek 2. Mechanismus tumorogeneze uroteliálního karcinomu močového měchýře. Převzato z Castillo-Martin et al., 2010 [11]



ABO – systém krevních skupin, p63 – protein 63, UP - uroplakin, HG – high grade tumoru,

LG – low grade tumoru, CK – cytokeratiny, LeX – hodnocení krevních skupin dle Lewis, INK4A – gen v povrchovém nádoru močového měchýře, H-RAS – Harvey rat sarcoma, FGFR3 – Fibroblastový růstový faktor receptoru 3, PI3K – PI3 kináza,

1.7 Přehled dalších nádorových markerů u karcinomu močového měchýře

„Nádorové markery jsou látky, jejichž stanovení ve tkáni nádoru nebo v krevním séru či jiných biologických tekutinách pacienta s neoplastickým onemocněním nám poskytne informaci o vlastnostech a chování nádoru. Termín „nádorové markery“ zahrnuje množství velmi různorodých látek, pro něž je společná asociace s maligním bujením.“ [12, str. 379] Nádorové markery neslouží pro diagnostiku, ale pro monitorování pacientů v průběhu léčby, popř. stanovení prognózy onemocnění. Pozitivní nález markeru má diagnostickou hodnotu, ovšem neznamená to, že při negativním nálezu není nádor přítomen. Pro diagnózu je rozhodující histopatologické vyšetření doplněné průkazem tumorových markerů (TM). Pokud je zvýšení TM pouze přechodné může to znamenat přítomnost nějakého zánětu,

nezhoubný nádor, toto zvýšení se může objevit po prodělaném traumatu, nebo po nasazení účinné terapie. Dříve se při interpretaci výsledků TM vycházelo z porovnání s referenčním rozmezím. Dnes se doporučuje určit individuální hladinu jedince, tzn. koncentraci TM ve stabilizovaném stavu například po operaci, kdy odstraníme nádorovou masu, a poté sledovat dynamiku změn. Dynamické sledování může dříve upozornit na některé nadcházející změny, jako například zvýšení TM, které jsou stále v referenčním rozmezí a může odhalit recidivu či metastázy dříve než počítačová tomografie nebo magnetická rezonance. Provádí se i systematická vyšetření, kdy dochází k opakovanému vyšetření po operacích. Zjišťuje se například, jak rychle vymizí TM z krevního oběhu. Z počátku je zvolen minimální časový odstup dvou týdnů, později jeden měsíc a následně tři měsíce, záleží ovšem na postupu ošetřujícího lékaře. Při sledování více tumorových markerů je větší pravděpodobnost záchytu nádoru, i když je tento postup ekonomicky náročnější, dosahuje se lepších výsledků. Z tohoto důvodu se většinou vybírají dva TM, které jsou pro danou oblast nejvhodnější. Prakticky žádný TM není specifický pro daný typ nádoru nebo jeho umístění [13].

Mezi často studované markery v současné době patří např.:

- NMP 22,
- cystatin B,
- BLCA 4 (bladder cancer 4)
- survivin,
- katepsin B, H, L a další.

NMP 22, nebo-li nuclear matrix protein 22, patří mezi proteiny nukleární matrix, což jsou polypeptidy, které jsou součástí vnitřní struktury jádra. Jsou důležité pro ovlivnění morfologie jádra, organizaci trojrozměrného uspořádání DNA, při replikaci DNA, transkripci RNA i při regulaci genové exprese. Ve srovnání s normálními uroteliálními buňkami je u nádorových buněk jejich intracelulární hladina dvacetpětkrát vyšší. Do moči se dostává nejspíše během apoptózy. „Test NMP22 je zaměřen na detekci jednoho z těchto proteinů v moči pomocí dvou monoklonálních protilátek na principu kvantitativní enzymové imunoanalýzy na imunosorbentech (ELISA).“ [6, str. 486]

Cystatin B je nádorový marker detekovatelný v moči. U karcinomu močového měchýře je cystatin B v moči zvýšený. Hladina cystatinu B v moči koreluje s rozvojem diferenciacie nádoru a stage nádoru [14].

BLCA 4, bladder cancer 4, má prokazatelně zvýšené hodnoty v moči u pacientů s nádory močového měchýře oproti jedincům s jiným onemocněním [6].

Survivin je inhibitor apoptózy, který je obsažen v buňkách uroteliálních nádorů, ale ne v normálním urotelu [6].

Dalšími významnými tumorovými markery využívanými k diagnostice nádorů močového měchýře jsou např. katepsiny. Ve své práci se budu věnovat konkrétně katepsinu B a jeho významu u pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře.

1.8 Biochemická charakteristika katepsinů

Katepsiny patří do nejpočetnější třídy enzymů tzv. hydroláz. Hydrolázy katalyzují hydrolytické štěpení vazeb, které vznikají kondenzací molekul za odštěpení vody. Mezi hydrolázy řadíme proteázy a peptidázy, které štěpí peptidové vazby, glykosidázy štěpící glykosidové vazby, esterasy štěpící esterové vazby. Hydrolázy plní řadu biochemicky nezastupitelných funkcí jako je například trávení, hemokoagulace pomocí thrombinu, pomocí fosfatáz regulují aktivitu enzymů, štěpením difosfátu posouvají rovnováhy reakcí, realizují endergonické procesy zajišťované ATPasami atd. [15].

Některé proteázy mají endo- i exopeptidázovou aktivitu. Proteázy nepotřebují ke své funkci kofaktory, některé z nich pouze vyžadují ke své činnosti přítomnost různých kovových iontů. Proteázy nejsou substrátově specifické a jsou schopné štěpit prakticky všechny bílkoviny.

Proteázy můžeme rozdělit do dvou skupin:

- endopeptidázy (proteínázy),
- exopeptidázy.

Exopeptidázy katalyzují odštěpení pouze koncových aminokyselin z polypeptidového řetězce. Mezi exopeptidázy řadíme metallopeptidázy, které katalyzují hydrolysu v tenkém střevě, střevní sliznici a vnitrobuněčnou proteolýzu u prokaryot a eukaryot [16].

Endopeptidázy katalyzují hydrolysu vazby uvnitř řetězce, přičemž vznikají peptidy různé velikosti [16, str. 86].

Endopeptidázy můžeme rozdělit na čtyři druhy podle typu katalytických skupin přítomných v aktivním místě:

- serinové proteázy,
- cysteinové (thiolové) proteázy,
- aspartátové (kyselé) proteázy,
- metalloproteázy.

Katepsiny jsou lyzozomální cysteinové proteázy. Tyto proteázy obsahují v aktivním centru aminokyseliny cystein a histidin.

Cysteinové proteázy jsou zastoupeny jak v lidském organismu, tak i u antropotropních virů, bakterií a parazitů. Hlavní funkci mají v recyklaci nitrobuněčných proteinů, degradaci proteinů po endocytóze, maturačním štěpení proteinových prekurzorů atd. [16, 17].

Mezi cysteinové proteázy řadíme:

- papain (katepsin B, H, L, S, C, K, O, F, V, X, W)
- kalpain (lidské kalpainy)
- kaspáza (kaspáza 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14)

Mezi přirozené inhibitory cysteinových proteáz můžeme zařadit:

- cysteinové nadrodiny: thyropiny a kalpastatiny,
- inhibitory apoptózy,
- alfa-2-makroglobulin,
- cystatin C.

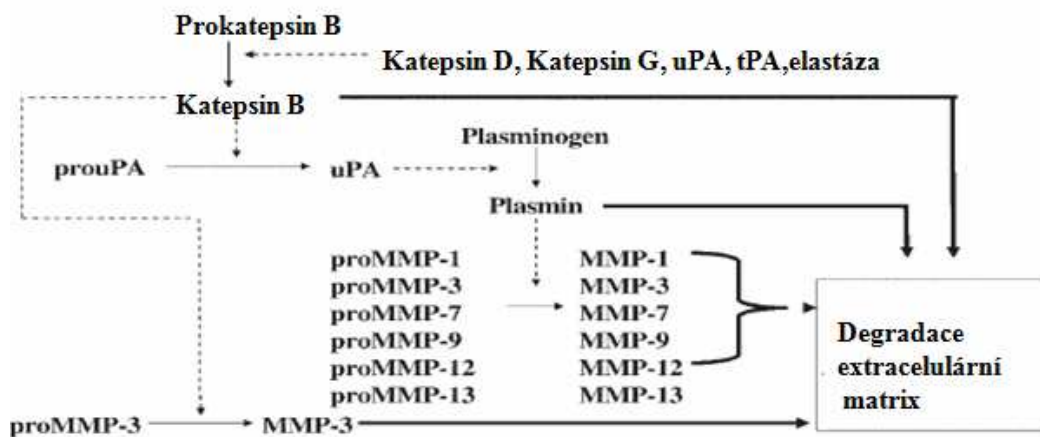
Mutace genů cysteinových proteáz nebo jejich inhibitorů vede k jejich následným poruchám [18].

1.8.1 Katepsin B

Katepsin B je jednořetězcový glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti 25 000 – 28 000 tvořený 230 – 250 aminokyselinovými zbytky. Je to thiol-dependentní proteáza patřící do rodiny papain cysteinových proteáz [16, str. 88]. Hlavní funkcí katepsinu B je degradace extracelulární matrix, metabolismus proteinů a udržování normálního metabolismu buněk (viz obrázek 3).

Extracelulární matrix (ECM), či mimobuněčná základní hmota, je materiál ukládající se v mezibuněčných prostorech. ECM obklopuje buňky pojivové tkáně, je jimi zároveň i produkována, avšak svým objemem je přesahuje. Mezi základní funkce ECM patří výměna informací – detekce, koordinace, tvorba chemických signálů, výměna látek – živin, produktu metabolismu, vody. Funguje i jako fyzická bariera proti mikroorganismům, účastní se při zánětech i hojení ran. Skládá se z proteinových vláken, amorfni hmoty a tkáňové tekutiny. Je to složitá směs glykoproteinů a proteoglykanů, přispívající k vazbě buněk na vláknité složky vaziva [19].

Obrázek 3. Proteolytická kaskáda vedoucí k degradaci extracelulární matrix [20]

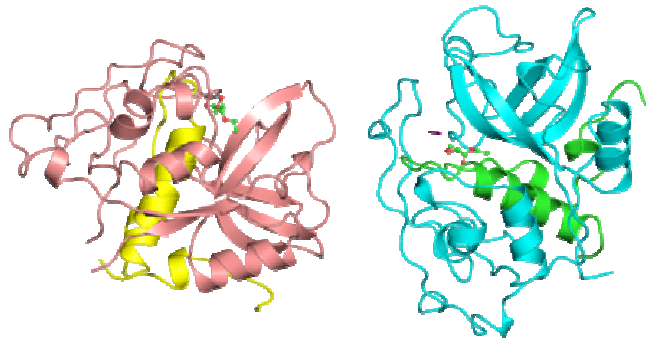


tPA – tkáňový aktivátor plasminogenu, uPA – urokinázový aktivátor plazminogenu, prouPA – proenzym urokinázového aktivátoru plazminogenu, MMP – matrix metalloproteinázy, proMMP – matrix metalloproteinázy zymogenu

Katepsin B je tvořen kaskádou přeměn, jež začínají syntézou preprokatepsinu B v drsném endoplazmatickém retikulu. K přeměně preprokatepsinu B na inaktivní formu prokatepsinu B, o molekulové hmotnosti 46 000, dochází pomocí interakce s manóza 6-fosfát kinázovým receptorem (MPR). Sacharidy jsou modifikovány a fosforylovány

v Golgiho aparátu, čímž vzniká rozpoznávací marker pro vazbu MPR. V normálních buňkách může být malé množství prokatepsinu B vyloučeno (< 5%), zbývající část je poté převedena do lysozomů přes endosomy, které jsou uvolněny z MPR a jsou přeměněny do jednořetězcové aktivní formy katepsinu B o molekulové hmotnosti 31 000. Zpracování prokatepsinu B je v normální buňce rychlé, trvá asi 30 minut. Pak následuje další přeměna katepsinu B v lysozomech do dvouřetězcové aktivní formy složené z těžkého řetězce o molekulové hmotnosti 26 000 a lehkého řetězce o molekulové hmotnosti 5 000. Struktura katepsinu B je shrnuta na obrázku 4 [21].

Obrázek 4. Struktura katepsinu B [22]



Katepsin B působí jako endopeptidáza. S jeho pomocí je rozštěpována vnitřní peptidická vazba v proteinu a v substrátu jsou podporovány hydrofobní postranní řetězce, snadno oddělitelné jsou dva N-terminální zbytky. Na rozdíl od jiných lysozomálních cysteinových proteáz, katepsin B přijme na tuto pozici arginin [23].

Kromě své role endopeptidázy, může katepsin B působit také jako exopeptidáza, která odstraňuje dipeptidy z C-konců, proteinů a peptidů [23].

1.8.2 Katepsin B v patologických stavech

Katepsin B je studován i vzhledem k jeho roli v patologických stavech, jako jsou progresivní nádory a artritidy. Nerovnováha mezi proteázami a jejich inhibitory koreluje s progresivitou nádoru [24]. Katepsin B je exprimován u nádorových procesů, podílí se na progresi řady tumorů (prsa, plíce, kolorektální karcinom, gliomy, prostata).

Při těchto onemocněních se zvýší genová i proteinová exprese katepsinu B. Na úrovni genu je pozměněna jeho amplifikace a zvýšena transkripce při použití jiných promotorů a jiného sestřihu. Tyto molekulární změny vedou ke zvýšení hladiny katepsinu B na úrovni proteinů a jeho opětovnému přerozdělení, vyloučení a zvýšení aktivity.

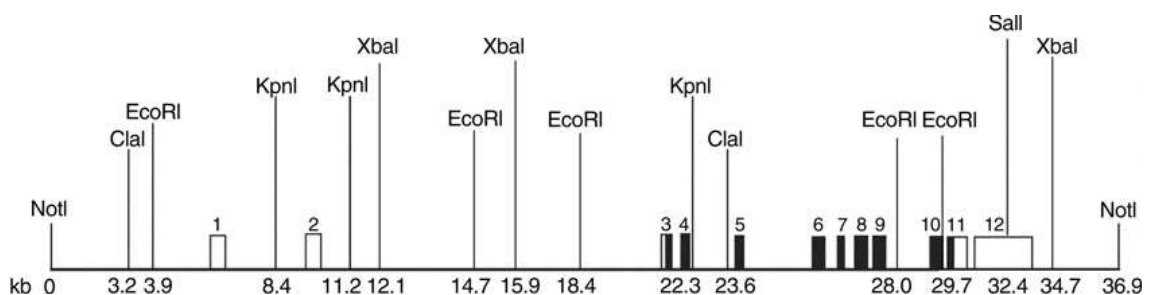
Za patologických podmínek může být regulace potlačena, což může mít za následek expresi a následně zvýšenou sekreci katepsinu B. Při zvýšené expresi membrána asociuje a sekrece katepsinu B je u různých nádorů zvýšená, včetně mozkových nádorů, nádorů tlustého střeva, plic nebo prostaty. Zvýšená exprese katepsinu B je také pozorována u revmatoidní artritidy a osteoartrózy. Ačkoli je v patologických stavech změněná distribuce a zvýšená produkce katepsinu B, může to být následkem chybné regulace na proteinové úrovni [20].

1.8.3 Gen pro katepsin B

Výzkum v oblasti molekulární regulace katepsinu B začal s izolací genu lidského katepsinu B. V roce 1986 izolovaly dvě výzkumné skupiny katepsin B z hepatocelulárního karcinomu a publikovaly sekvence genu CT SB [20].

Gen CT SB je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 8, 8p22. Gen je složen z 12 exonů, které jsou vyobrazeny na obrázku 5. Vlastní protein je kódován exony 3 až 11. V patologických stavech byl nalezen u karcinomu mezi 2 až 3 exonem ještě tzv. „hybridní exon“ 2a/2b [25]. Promotorová oblast genu má vysokou oblast GC sekvencí (80 %) a obsahuje řadu transkripčních faktorů nepostradatelných pro činnost enzymové aktivity. Gen je exprimován u karcinomu prsu, hepatocelulárního karcinomu, kolorektálního karcinomu, karcinomu prostaty, jícnu a žaludku [20].

Obrázek 5. Exony/introny ve struktuře katepsinu B [21]



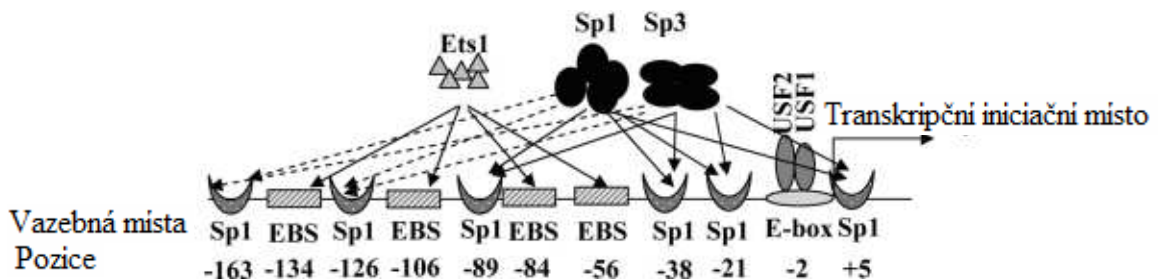
Plné boxy představují překládané sekvence (exony) a prázdné boxy nepřekládané oblasti (UTR)

U všech karcinomů byla popsána i zásadní role transkripčních faktorů. Prostřednictvím imunochemických, histochemických a blotovacích technik byla prokázána korelace exprese katepsinu B s invazivitou a diferenciací nádoru.

Expese katepsinu B může být regulována na různých úrovních od amplifikace genu po posttranslační modifikace. Amplifikace může přispívat k maligní progresi

nádoru a premaligním lézím. Translace začíná v exonu 3. Byly identifikovány tři potenciální promotory. Hlavní promotor je bohatý na sekvence GC a obsahuje méně TATA boxů. Tento promotor má 6 vazebných míst. Na těchto místech jsou schopné se navázat transkripční faktory, které pak vyvolávají aktivitu promotoru. Tuto aktivitu mohou redukovat mutace. Jedním z transkripčních faktorů zvyšující promotorovou aktivitu katepsinu B je Ets. Ets1 indukce expresi řady proteáz spojených s maligní progresí tumoru. Jiným regulačním mechanismem, který zprostředkovává exprese katepsinu B je alternativní sestřih. Alternativní sestřih na 5'-UTR (nepřekládaná oblast) produkuje 6 mRNA variant transkriptů. Alternativním sestřihem 5'-překládané oblasti dochází k dalším dvěma transkripčním variantám [21]. Regulační elementy jsou ukázány na obrázku 6.

Obrázek 6. Schematické znázornění regulačních elementů v promotoru katepsinu B a předpokládané transkripční faktory, které se váží na tyto elementy [20]



Plné čáry na obrázku 6 reprezentují potvrzené interakce transkripčních faktorů s vazebným místem. Tečkované čáry znázorňují potenciální interakce dosud neprostudované.

2 CÍLE PRÁCE

- 1. Stanovit koncentrace katepsinu B v moči a v séru u pacientů s karcinomem močového měchýře.**
- 2. Posoudit možnost využití získaných výsledků k monitorování a v diagnostice karcinomu močového měchýře s ohledem na určení míry diferenciacce a invazivity nádoru.**

3 MATERIÁL, METODY A PŘÍSTROJE

3.1 Reagenční souprava Quantikine ELISA na stanovení katepsinu B

The Quantikine Human Pro-Cathepsin B Immunoassay slouží ke kvantitativnímu stanovení koncentrace pro-katepsinu B v supernatantu buněčných kultur, v buněčných lysátech, v séru, plasmě, slinách a v moči. Podrobná specifikace diagnostické soupravy je uvedena v tabulce č. 3 [26].

Tabulka č. 3.: Specifikace diagnostické soupravy The Quantikine Human Pro-Cathepsin B Immunoassay od výrobce R&D Systems [26]

| Katalogové číslo | Název | Dodavatel | Výrobce |
|------------------|--|---------------------|-------------|
| DCATB0 | The Quantikine Human Pro-Cathepsin B Immunoassay | Biomedica CS, s.r.o | R&D Systems |

3.1.1 Reagencie

Všechny reagencie potřebné k provedení jednotlivých kroků jsou dodávány společně v reagenční soupravě od výrobce.

- Mikrotitrační destičky pro-katepsin B (Pro-Cathepsin B Microplate)
 - 12 stripů s 8 jamkami potaženými myší monoklonální protilátkou proti pro-katepsinu B
- Konjugát pro-katepsinu B (Pro-Cathepsin B Conjugate)
 - 21 ml myší monoklonální protilátky proti pro-katepsinu B konjugovaného s křenovou peroxidasou s konzervanty
- Standard pro-katepsinu B (Pro-Cathepsin B Standard)
 - 100 ng rekombinantního pro-katepsinu B v základním pufovacím proteinu s konzervanty, lyofilizovaný
- Ředící roztok (Assay Diluent RD1-34)
 - 11 ml základního pufovacího proteinu s konzervanty

- Koncentrovaný ředící kalibrátor (Calibrator Diluent RD5-34 Concentrate)
 - 21 ml koncentrovaného pufovacího roztoku s konzervanty
- Koncentrovaný promývací roztok (Wash Buffer Concentrate)
 - 21 ml 25 násobně koncentrovaného roztoku s pufovacími povrchově aktivními látkami s konzervanty
- Barevné činidlo A (Color reagent A)
 - 12 ml stabilního peroxidu vodíku
- Barevné činidlo B (Color reagent B)
 - 12 ml stabilního chromogenu (tetramethylbenzidin)
- Stop roztok (Stop Solution)
 - 6 ml 2M kyseliny sírové

3.2 Princip enzymové imunoanalýzy

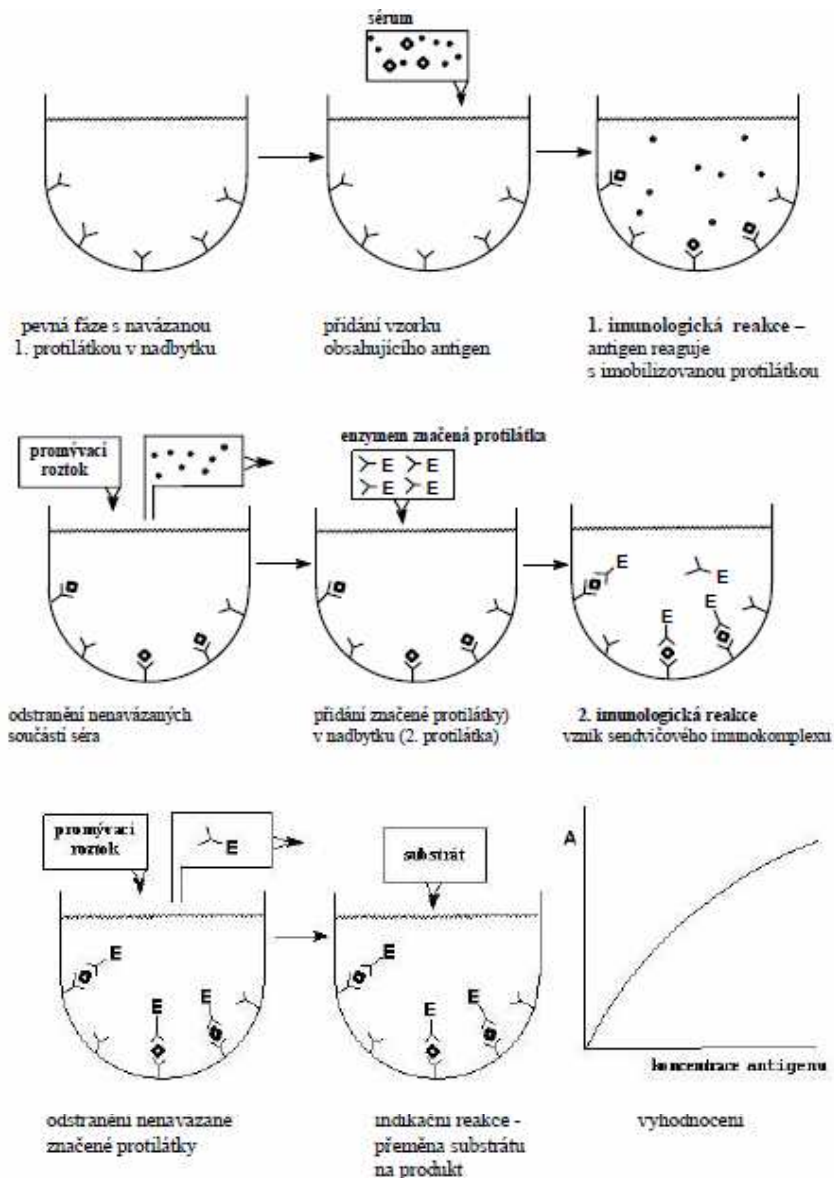
Principem metody je nekompetitivní enzymová imunoanalýza, při které vzniká sendvičový komplex. Obecně má sendvičová analýza nejvyšší úroveň sensitivity a specifity. Tato metoda je vhodná pro stanovení velkých antigenů, které mají několik míst pro protilátku. Pro realizaci metody jsou nutné dvě různé protilátky namířené proti různým determinantám stanovovaného antigenu. První protilátka je v nadbytku navázána na pevnou fázi. K imobilizované protilátce jsou přidány vyšetřované vzorky nebo standardy obsahující antigen [27, 28].

Antigen se na první protilátku navazuje v průběhu inkubace. Tím, že je protilátka v nadbytku, je všechen analyt vyvázan. Promytím jsou po inkubaci odstraněny všechny nezreagované složky. Druhá protilátka značená enzymem je také přidána v nadbytku. Tato protilátka tedy reaguje s další antigenní determinantou vyšetřovaného antigenu. Vzniká sendvičový komplex. Analyt je vázán mezi dvěma specifickými protilátkami. Jedna protilátka je navázána na pevné fázi – antigen – druhá protilátka je značena enzymem. Po odstranění nezreagovaného konjugátu se přidá substrát. Na konci enzymové reakce změříme absorbanci produktu. Množství navázané, značené protilátky je úměrné množství analytu ve vzorku [27, 28]. Schéma této metody je zobrazeno na obrázku 7.

The Quantikine Human Pro-Cathepsin B Immunoassay používá specifické monoklonální protilátky pro katepsin B, které jsou potažené na mikrotitrační destičce. Standardy i vzorky jsou pipetovány do jamek a každý přítomný pro-katepsin B je vázán na imobilizovanou protilátku. Po promytí nenavázaných substancí jsou enzymově

spojené monoklonální protilátky pro katepsin B přidány do jamek. Následuje opětovné promytí, po němž je ke každému nenavázanému protilátkovému činidlu přidán do jamek substrátový roztok. Po tomto kroku dochází k barevné změně, která je rovna množství k pro-katepsinu B navázaného v prvním kroku. Po určitém čase je barevná změna zastavena pomocí příslušného stop-roztoku a její intenzita je změřena [26].

Obrázek 7. Sendvičová imunoanalýza pro stanovení antigenu [26]



3.3 Přístrojové vybavení

- Vodní vývěva,
- Přesně nastavitelné mikropipety 10 μ l – 1000 μ l

- Vortex,
- Centrifuga ALC 4214 (ALC International s.r.o.),
- Lednice Liebherr s monitorováním teplot pomocí systému Falcon,
- Spektrofotometr (Sunrise Absorbance Reader, Tecan).

Dále byl použit spotřební materiál, který je zapotřebí k provedení metody, což zahrnuje eppendorfky, buničinu, špičky (v závislosti na objemu pipety) a ochranné pomůcky (rukavice).

3.4 Pracovní postup pro The Quantikine Human Pro-Cathepsin B

Immunoassay

Krev pro přípravu séra se odebírá do zkumavek se separačním gelem a aktivátorem srážení (pro přípravu séra). Krev se nechá při pokojové teplotě po dobu 30 minut srážet a poté se centrifuguje 15 minut při 1000 x g. Poté je sérum odděleno a buď může být vzorek ihned změřen nebo je rozpipetován do několika vzorků a zamrazen při -20°C. Rozpipetováním prvotního vzorku do více vzorků je vyvarováno opětovnému rozmrazení-zamrazení daného vzorku [26].

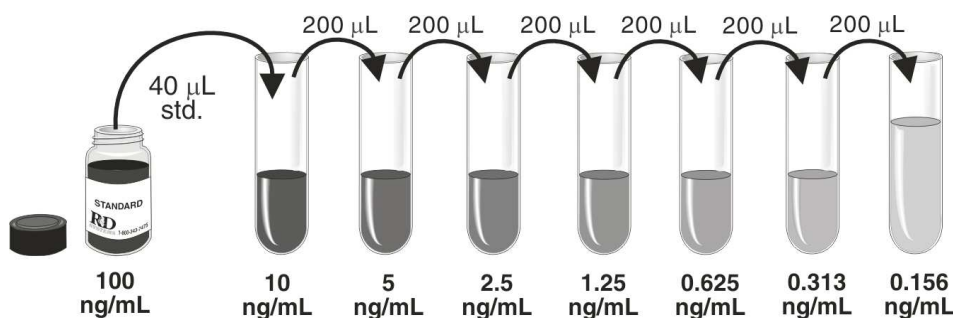
Pro vyšetření moči je nejvhodnější první ranní odběr ze středního proudu, protože je tato moč koncentrovanější a má nižší pH. Moč se odebírá do plastové zkumavky tomu určené. Před samotným odběrem by měly být genitálie omyté. V laboratoři se moč centrifuguje pro odstranění nežádoucích částic. Poté se může moč ihned stanovit nebo stejně jako u séra rozpipetovat do jednotlivých vzorků a zamrazit při -20°C [26].

Pracovní postup zahrnuje následující kroky:

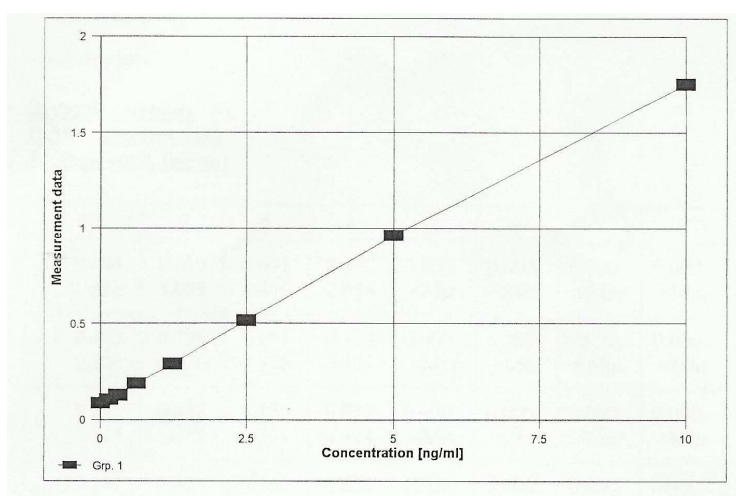
1. Nejprve je připraven standard pro-katepsin B, a to tak, že je k němu přidán 1 ml destilované vody a nechá se nejméně 15 minut rozpouštět. Před použitím se musí jemně promíchat.
2. Připraví se ředící kalibrátor RD5-34 (1x) z koncentrovaného RD5-34 tak, že se naředí 10 ml tohoto kalibrátoru s 10 ml destilované vody.
3. Nachystají se vyšetřované vzorky:
 - a. Moč: 100 µl vzorku moče je ředěno 100 µl ředícího kalibrátoru RD5-34 (1x)
 - b. Sérum: 10 µl vzorku séra je ředěno 190 µl koncentrovaným ředícím kalibrátorem RD5-34

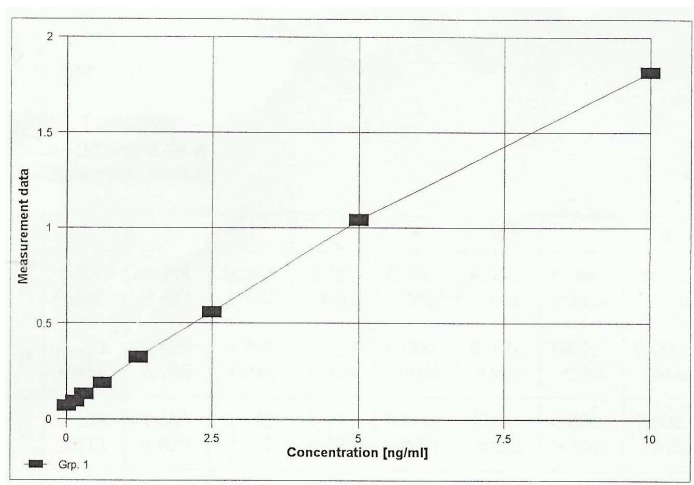
4. Připraví se kalibrační řada ze 7 bodů pro změření kalibrační křivky. Kalibrace se připravuje postupným ředěním. Do první zkumavky se přidá 360 μL ředícího kalibrátoru RD5-34 (1x) (u moči) nebo koncentrovaného ředícího kalibrátoru RD5-34 (sérum) a to se smíchá s 40 μL standardu pro-katepsinu B. Do všech ostatních zkumavek v kalibrační řadě se napipetuje 200 μL odpovídajícího ředícího kalibrátoru. Poté se z první zkumavky odebere 200 μL do druhé zkumavky a sekvenčně se stejným způsobem naředí ostatní standardy, viz obrázek 8. Jako nulový bod slouží odpovídající ředící kalibrátor danému vzorku (moč, sérum). Na obrázcích 9 a 10 jsou ukázány příklady kalibračních křivek pro sérum a moč.

Obrázek 8. Příklad sekvenčního ředění při tvorbě kalibrační křivky [26]



Obrázek 9. Příklad kalibrační křivky pro sérum



Obrázek 10. Příklad kalibrační křivky pro moč

5. Připravíme si promývací roztok. Vznikne zředěním 20 ml koncentrovaného promývacího roztoku do 500 ml destilované vody.
6. Připraví se mikrotitrační destička a nechá se na ni pouze tolik stripů kolik je vzorků. Ostatní se vrátí do fólie, která je chrání proti vlhkosti.
7. Do každé jamky se přidá 100 μ l ředícího roztoku RD1-34.
8. Do každé jamky se přidá 50 μ l standardu a vzorku. Poté se nechá 2 hodiny inkubovat při teplotě 2 - 8 $^{\circ}$ C.
9. Každá jamka se čtyřikrát odsaje a promyje připraveným promývacím roztokem.
10. Přidá se 200 μ l konjugátu pro-katepsinu B do každé jamky. Nechá se znovu 2 hodiny inkubovat.
11. Každá jamka se čtyřikrát odsaje a promyje připraveným promývacím roztokem.
12. 15 minut před použitím se připraví roztok substrátu (barevné činidlo A, B), který se musí chránit před světlem. Substrát připravíme smícháním barevného činidla A s barevným činidlem B ve stejném objemu (4 ml + 4 ml).
13. Do každé jamky se přidá 200 μ l roztoku substrátu. Inkubace trvá 30 minut při pokojové teplotě a musí se chránit před světlem.
14. Přidá se 50 μ l stop roztoku do každé jamky. Barva by se měla změnit z modré na žlutou.
15. Výsledná barevná změna na stripech je změřena pomocí spektrofotometru při 540 nm nebo 570 nm.

Katepsin B je při maligních procesech vylučován do moči. Koncentrace katepsinu B může být v moči zvýšená díky glomerulární filtraci a také záleží na diuréze.

Korekce koncentrace katepsinu B v moči na kreatinin je potřebná k eliminaci vlivu diurézy [24]. Koncentrace katepsinu B v moči tedy byla vyjádřena jako μg katepsinu B na mmol kreatininu.

3.5 Stanovení kreatininu

Kreatinin vzniká dehydratací kreatinu, který je uvolňován z kreatinfosfátu při svalové činnosti. Koncentrace kreatininu v krvi je úměrná svalové hmotě a nepodléhá větším změnám, pouze vzrůstá při onemocnění ledvin. Kreatinin je využíván k vyšetření funkce ledvin, pomocí kreatininové clearance, jelikož je bezprahově vylučován močí. Ke stanovení kreatininu v séru a v moči se používají chemické a enzymové metody [29].

V této práci bylo použito enzymatické metody, která je založena na kaskádě enzymových reakcí. V prvním kroku je kreatinin převeden na kreatin, který je pak následně převeden enzymatickou reakcí na konečné produkty (NAD, peroxid vodíku). Konečné produkty jsou pak stanoveny fotometrickou reakcí [29].

Ke stanovení kreatininu v moči byla použita enzymatická kreatindeaminázová metoda. Tato metoda byla provedena na analyzátoru Advia 1800 (Siemens Medical, Diagnostics, USA).

3.6 Statistická analýza

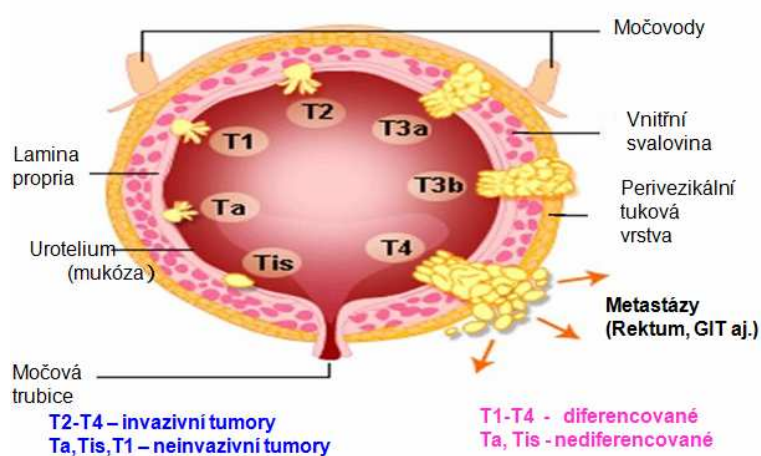
Rozdíly mezi jednotlivými podskupinami byly testovány neparametrickým Mann Whitney U-testem. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. K provedení statistické analýzy a k vypočítání Mann Whitneyova testu byl použit program GraphPad Prism, verze 5.0.

4 PACIENTI

4.1 Charakteristika pacientů

Vzorky moče a séra pacientů s karcinomem močového měchýře byly zamrazeny a udržovány při teplotě -70°C , dokud nebyly analyzovány. Koncentrace katepsinu B v moči a v séru byla měřena u 48 pacientů, 32 mužů a 16 žen. Průměrný věk sledovaných pacientů je 66,5 let. Kontrolní skupinu tvořilo 30 zdravých jedinců (13 mužů, 17 žen, průměrný věk 59 let). Pacienti byli rozděleni do skupin dle diferenciace tumoru (diferencované tumory - low grade tumory a nediferencované tumory - high grade tumory) podle invazivity na invazivní (pT2, pT3 a pT4) a neinvazivní tumory (pTa, pT1) [24]. Jednotlivé typy nádorů močového měchýře jsou uvedeny na obrázku 11.

Obrázek 11. Typy nádorů močového měchýře [29]



Charakteristika pacientů je shrnuta v tabulkách č. 4 – 6. Referenční hodnoty katepsinu B v moči a v séru byly převzaty od dodavatele ELISA kitu. Referenční hodnoty pro sérum katepsinu B jsou 27 – 126 $\mu\text{g/L}$, pro moč jsou 0 – 2,54 $\mu\text{g/L}$, pro kreatinin jsou 5,7 – 14,7 mmol/L [26]. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr nebo medián, v závorkách je uvedeno rozpětí hodnot.

Tabulka č. 4.: Charakteristika pacientů a kontrolní skupiny

| | Kontrolní skupina (N=30) | Pacienti (N=48) | P – hodnota |
|---|-----------------------------|-------------------------|-------------|
| Muži/Ženy | 13/17 | 32/16 | - |
| Průměrný věk (rozsah) | 59,2 (28 – 92) | 66,5 (43 – 83) | - |
| S-katepsin B (μg/L) Medián (rozsah) | 75,52 (43,44 – 163,88) | 81,15 (0 – 188,72) | 0.90 |
| U-katepsin B (μg/L) Medián (rozsah) | 1,48 (0,42 – 16,78) | 6,42 (1,07 – 26,296) | < 0.0001 |
| U-kreatinin (mmol/L) Medián (rozsah) | 7,35 (3,00 – 28,20) | 8,08 (1,1 – 28,3) | 0.86 |
| U-katepsin B/U-kreatinin (μg/mmol kreatininu) Medián (rozsah) | 0,20 (0,07 – 2,21) | 0,83 (0,144 – 9,985) | < 0.0001 |

Hodnota *P* je vypočtena z Mann-Whitneyova testu, U-katepsin B – katepsin B v moči, S-katepsin B – katepsin B v séru.

Tabulka č. 5.: Charakteristika pacientů podle diferenciacie a invazivity tumoru

| | Low grade (N=11) | High grade (N=37) | Neinvazivní (N=19) | Invazivní (N=29) |
|---|------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------|
| Muži/Ženy | 9/2 | 23/14 | 13/6 | 19/10 |
| Průměrný věk (rozsah) | 69.6 (52 – 80) | 65.6 (43 – 83) | 68.8 (56 – 80) | 65.0 (43 – 83) |
| S-katepsin B (μg/L) Medián (rozsah) | 81.98 (0 – 140,86) | 80.32 (30,16 – 188, 72) | 80.32 (0 – 188,72) | 84.78 (44,64 – 164,32) |
| U-katepsin B (μg/L) Medián (rozsah) | 4.09 (1,07 – 20,00) | 6.99 (1,32 – 26,30) | 4.10 (1,07 – 20,00) | 8.03 (1,51 – 26,30) |
| U-kreatinin (mmol/L) Medián (rozsah) | 8.00 (3,80 – 21,00) | 8.16 (1,10 – 28,30) | 8.30 (3,90 – 16,10) | 7.72 (1,10 – 21,00) |
| U-katepsin B/U- kreatinin (μg/mmol kreatininu) Medián (rozsah) | 0.49 (0,21 – 3,02) | 0.87 (0,14 – 9,99) | 0.52 (0,14 – 2,50) | 1.47 (0,21– 9,99) |

Tabulka č. 6.: Charakteristika pacientů podle invazivity v low grade (LG) a high grade (HG) skupině pacientů

| | Invazivní tumory v LG u pacientů (N=2) | Invazivní tumory v HG u pacientů (N=27) | Neinvazivní tumory v LG u pacientů (N=9) | Neinvazivní tumory v HG u pacientů (N=10) |
|--|--|---|--|---|
| Muži/Ženy | 2/0 | 17/10 | 7/2 | 6/4 |
| Průměrný věk (rozsah) | 61.0 (52 – 70) | 65.3 (43 – 83) | 71.6 (62 – 80) | 66.4 (56 – 82) |
| S-katepsin B (µg/L) Medián (rozsah) | 87.19 (59,74 – 114,64) | 84.78 (30,16 – 164,32) | 91.98 (0 – 140,86) | 75.51 (41,40 – 188,72) |
| U-katepsin B (µg/L) Medián (rozsah) | 8.72 (5,97 – 11,46) | 8.03 (1,51 – 26,30) | 3.56 (1,07 – 20,00) | 4.41 (1,32 – 9,22) |
| U-kreatinin (mmol/L) Medián (rozsah) | 12.4 (3,80 – 21,00) | 7.72 (1,10 – 28,30) | 8 (4,20 – 15,97) | 8.71 (3,90 – 16,10) |
| U-katepsin B/U-kreatinin (µg/mmol kreatininu) Medián (rozsah) | 1.65 (0,28 – 3,02) | 1.47 (0,21 – 9,99) | 0.49 (0,21 – 2,50) | 0.54 (0,14 – 1,18) |

HG – high grade, LG – low grade, U-katepsin B – katepsin B v moči, S- katepsin B – katepsin B v séru.

5 VÝSLEDKY

Hladina katepsinu B v moči i v séru u pacientů s karcinomem močového měchýře byla zvýšená oproti kontrolní skupině (pro katepsin B v moči byla hodnota $P < 0.0001$, pro poměr katepsinu B/kreatinin v moči byla hodnota $P < 0.0001$), jak je ukázáno v tabulce č. 4. V tabulce č. 7 jsou shrnuty výsledky statistického porovnání katepsinu B v jednotlivých skupinách vzhledem ke kontrolní skupině.

Tabulka č. 7.: P - hodnoty Mann Whitneyova testu získané při porovnávání výsledků koncentrace katepsinu B a kreatininu mezi skupinami pacientů a kontrolní skupinou

| Skupina pacientů | P – hodnota získaná při porovnání s kontrolní skupinou | | | |
|-------------------------|--|--------------------|-------------|--------------------------|
| | S-katepsin B | U-katepsin B | U-kreatinin | U-katepsin B/U-kreatinin |
| Low grade tumoru | 0.8637 | 0.0036 | 0.9063 | 0.0009 |
| High grade tumoru | 0.6465 | < 0.0001 | 0.7863 | < 0.0001 |
| Neinvazivní tumory | 0.7615 | 0.0012 | 0.5586 | 0.0003 |
| Invazivní tumory | 0.6840 | < 0.0001 | 0.8675 | < 0.0001 |
| Invazivní tumory v HG | 0,7174 | < 0.0001 | 0.8604 | < 0.0001 |
| Neinvazivní tumory v LG | 0.7366 | 0.0164 | 0.8939 | 0.0026 |
| Neinvazivní tumory v HG | 0.8945 | 0.0076 | 0.3026 | 0.0083 |

Hodnota P je vypočtena z Mann-Whitneyova testu. Signifikantní výsledky jsou tučně vyznačeny.

U high grade je poměr katepsinu na kreatinin v moči ($P < 0.0001$) a hladina katepsinu B v moči ($P < 0.0001$) významně zvýšená oproti kontrolní skupině. U low grade tumoru byla významně zvýšená hladina katepsinu B v moči ($P = 0.0036$) a poměr katepsinu B na kreatinin v moči ($P = 0.0009$). Hladina katepsinu B v séru high grade a low grade tumoru není zvýšená. Mediány jsou zobrazeny v tabulce č. 5. a výsledné P – hodnoty jsou v tabulce č. 7.

V tabulce č. 6 jsou shrnuty hodnoty týkající se invazivity v low grade a high grade skupině pacientů. Jak je vidět v tabulce č. 7., u pacientů s invazivním diferencovaným tumorem je významný rozdíl v poměru katepsinu B na kreatinin v moči ($P < 0.0001$) a hladině katepsinu B v moči ($P < 0.0001$). Invazivní tumor u low grade pacientů nemohl být stanoven z důvodu malého počtu jedinců ve skupině.

U pacientů s nediferencovaným neinvazivním tumorem je významný rozdíl v poměru katepsinu B na kreatinin v moči ($P = 0.0026$) a hladině katepsinu B v moči ($P = 0.0164$). U neinvazivního tumoru v high grade skupině pacientů je významný rozdíl v hladině katepsinu B v moči ($P = 0.0076$) a v poměru katepsinu B na kreatinin v moči ($P = 0.0083$). Koncentrace katepsinu B v séru u invazivních i neinvazivních tumorů nebyla statisticky významně odlišná.

6 DISKUZE

Cílem této práce bylo stanovení koncentrace katepsinu B v moči a v séru u pacientů s karcinomem močového měchýře. Získané výsledky lze následně využít v monitorování a v diagnostice onemocnění, k určení míry diferenciaci a invazivity nádoru. Důvodem stanovení koncentrace katepsinu B, jako tumorového markeru pro vyšetření karcinomu močového měchýře, je optimalizace diagnostiky toho onemocnění a také to, že prací zabývajících se touto problematikou není mnoho. U nádorových procesů je katepsin B exprimován a podílí se na progresi řady tumorů (prsa, plíce, kolorektální karcinom, gliomy, prostata). Ve srovnání s kontrolní skupinou je katepsin B v moči u karcinomů zvýšený. Uvedené výsledky odpovídají výsledkům doposud publikovaných studií, které se zabývají aktivitou a koncentrací katepsinů u karcinomu močového měchýře. Např. jedna ze studií zabývajících se zvýšenou expresí katepsinu B u karcinomu močového měchýře s invazivitou nádoru, prokázala korelaci diferenciaci s progresí tumoru. Ve výsledku byla zvýšená exprese katepsinu B více u invazivního karcinomu než u povrchového tumoru močového měchýře. V této studii byl katepsin B ve tkáni stanoven imunohistochemickými metodami a Western blotem [31].

Koncentrace katepsinu B v séru koreluje s diferenciací karcinomu močového měchýře a tuto korelaci můžeme nalézt i pro hladinu katepsinu B v moči ($P = 0.0036$ a $P < 0.0001$) a s poměrem U-katepsin B/U-kreatinin ($P = 0.0009$ a $P < 0.0001$). Korelace katepsinu B v séru s diferenciací nádoru může být podpořena tím, že invazivní high grade karcinomy močového měchýře jsou často asociovány s metastázami v lymfatických uzlinách a v pletenci pánevním (25 % všech invazivních tumorů) se vzdálenými metastázami do plic, jater, kostí, krku a centrálního nervového systému, což představuje vysoký stupeň angioinvazivity [32, 33]. Vysoký stupeň angioinvazivity vede ke zvýšení přenosu katepsinu B cévní stěnou, čímž dochází k nárůstu jeho koncentrace v séru. Elevace katepsinu B v séru je významně nižší než v moči (pro moč je medián = 1.48 $\mu\text{g/l}$ vs. 6.42 $\mu\text{g/l}$, $P < 0.0001$; pro sérum je medián = 75.52 $\mu\text{g/l}$ vs. 81.15 $\mu\text{g/l}$, $P = 0.90$). Tento předpoklad je podpořen tím, že ze skupiny 37 pacientů s high grade tumorem má 27 pacientů invazivní high grade karcinom močového měchýře a 18 z nich má high grade karcinom močového měchýře spojený s metastázami. Z těchto výsledků vyplývá, že odpovídající diagnostické výsledky poskytuje poměr katepsinu B a kreatininu v moči. Katepsin B je vylučován

při maligních procesech do moči. Jeho koncentrace může být v moči zvýšená díky glomerulární filtraci a také záleží na diuréze. Korekce koncentrace katepsinu B v moči na kreatinin je potřebná k eliminaci vlivu diurézy.

Neprůkazné výsledky koncentrace katepsinu B v moči korelují s výsledky publikovanými v jiných studiích. Publikované výsledky ukazují rozsah *P* - hodnoty aktivity katepsinu B v moči mezi 0,1 až 0,28 podle diferenciaci karcinomu močového měchýře [34]. Podobně v další studii je rozsah *P* – hodnot pro aktivitu katepsinu B mezi 0,43 a 0,557 [35].

Koncentrace katepsinu B v moči koreluje s invazivitou tumoru. Koncentrace poměru katepsinu B/kreatinin v moči a katepsinu B v moči jsou významně zvýšené u pacientů s invazivním tumorem ($P < 0.0001$ a $P < 0.0001$). Naopak hladina katepsinu B v séru není významně rozdílná ($P = 0.6840$). Tyto výsledky korelují s výsledky jiných studií. Například jedna ze studií ukazuje korelaci exprese lysozomálních proteolytických enzymů katepsinů B, H a L s progresí nádoru v různých novotvarech. Jednotlivé katepsiny byly stanoveny v moči spektrofotometrickou metodou. V této studii bylo zjištěno, že invazivita i diferenciaci karcinomu močového měchýře koreluje s katepsinem L, ale nikoliv s katepsiny B a H [36]. V další studii byla prokázána pozitivní asociace katepsinu B v tkáni s invazivitou i high grade tumoru [37]. Obě tyto studie demonstrovaly zvýšenou expresi katepsinu B u invazivního karcinomu močového měchýře. Opačné výsledky prezentuje studie autorů Svatek et al., 2008, která neprokazuje žádnou významnou aktivitu katepsinu B související s tumorem [35].

Vztah mezi koncentrací katepsinu B u zdravých jedinců a pacientů může být významný v několika aspektech. Pro diagnózu primárního tumoru, včetně screeningu, je důležité prvotní stanovení koncentrace katepsinu B pacienta vůči populaci zdravých jedinců. V dalším kroku je porovnávána koncentrace katepsinu B u pacientů s recidivou (především u povrchových nádorů po transuretrální resekci) a relapsem onemocnění u pacientů po cystektomii. Toto porovnání je využito k diagnostice karcinomu močového měchýře. Díky tomuto můžeme předpokládat redukci kontrol pomocí cystoskopie.

K posouzení výše uvedených aspektů vztahu katepsinu B s diagnostickým procesem je potřeba stanovit hodnoty cut-off. Hodnoty cut-off pro sérum i moč byly spočítány z maximální specificity, senzitivity a prediktivní hodnoty. Diagnostická specifita katepsinu B pro moč byla 87% s pozitivní prediktivní hodnotou 76%. Specifita pro poměr katepsinu B na kreatinin v moči byla 89% s pozitivní prediktivní

hodnotou 77%. Specificita pro katepsin B v séru byla 92% s pozitivní prediktivní hodnotou 83% [24]. Tyto výsledky potvrzují význam katepsinu B v diagnostice karcinomu močového měchýře, ale vzhledem k nízké senzitivitě (33 – 59%) se nehodí ke screeningu.

Měření koncentrace katepsinu B v moči a jeho poměr vztažený na kreatinin v moči může být potenciálním tumorovým markerem u pacientů s karcinomem močového měchýře.

7 ZÁVĚR

Enzymatické stanovení koncentrace katepsinu B v moči a určení poměru katepsinu B na kreatinin v moči je vhodnou metodou pro diagnostiku karcinomu močového měchýře.

Koncentrace katepsinu B v moči a poměr katepsinu B na kreatinin v moči jsou zvýšené u pacientů s karcinomem močového měchýře. Nejlepším ukazatelem přítomnosti karcinomu močového měchýře je stanovení poměru katepsinu B na kreatinin v moči. U invazivních a diferencovaných nádorů je vhodné stanovit hladinu katepsinu B v moči a poměr koncentrace katepsinu B na kreatinin v moči. Koncentrace katepsinu B v séru u invazivních i neinvazivních tumorů nebyla statisticky významně odlišná.

Katepsin B je vhodným markerem pro diagnostiku uroteliálního karcinomu močového měchýře a koncentrace v moči velmi dobře koreluje s diferenciací a invazivitou.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------|--|
| AB0 | Systém krevních skupin |
| ATP | Adenosintrifosfát |
| BLCA 4 | Bladder cancer 4 |
| C | Cytosin |
| CK | Cytokeratin |
| CR-5 | Cytokeratin 5 |
| CTSB | Gen pro katepsin B |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| EBV | Epstein Barr virus |
| ECM | Extracelulární matrix |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| Ets | Transkripční faktor |
| FGFR3 | The fibroblast growth factor receptor 3 |
| G | Guanin |
| G1 | Dobře diferencovaný nádor |
| G2 | Středně diferencovaný nádor |
| G3 | Málo diferencovaný nádor |
| HG | High grade tumor |
| H-RAS | Harvey rat sarcoma |
| INK4A | Gen v povrchovém nádoru močového měchýře |
| LeX | Hodnocení krevních skupin dle Lewis |
| LG | Low grade tumor |
| MMP | Matrix metalloproteinase |
| MPR | Manóza 6-fosfát kinázový receptor |
| mRNA | Messengerová ribonukleová kyselina |
| MX | Vzdálené metastázy nelze hodnotit |
| M0 | Bez vzdálených metastáz |
| M1 | Vzdálené metastázy |
| N | Počet jedinců |
| NAD | Nikotinamid adenin dinukleotid |
| NMP22 | Nuclear matrix protein 22 |
| NX | Regionální mízní uzliny nelze hodnotit |

| | |
|--------------|---|
| N0 | Regionální mízní uzliny bez metastáz |
| N1 | Metastáza v jediné mízní uzlině malé pánve (hypogastrické, Obturátorové, zevní ilické nebo presakrální) |
| N2 | Metastáza ve vícečetných mízních uzlinách malé pánve (hypogastrických, obturátorových, zevních ilických nebo presakrálních) |
| N3 | Metastáza ve společné ilické mízní uzlině (uzlinách) |
| pH | Vodíkový potenciál |
| PI3K | PI3 kináza |
| proMMP | Matrix metalloproteinase zymogen |
| prouPA | Proenzym urokinase-type plasminogen activator |
| PTEN | Gen pro tyrosinfosfatázu |
| pT0 | Označení pro negativní histologický nález primárního tumoru při jeho patologické klasifikaci |
| pT2 | Označení pro pozitivní histologický nález primárního tumoru při jeho patologické klasifikaci |
| p63 | Protein 63 |
| RB | Retinoblastoma |
| S-katepsin B | katepsin B v séru |
| tPA | Tissue Plasminogen Activator, tkáňový aktivátor plazminogenu |
| TP53 | gen kódující příslušný protein p53 |
| TUR | transuretrální resekce nádoru |
| TNM | Klasifikace nádorů, T – tumor, N – uzliny, M – metastaze |
| TM | Tumorový marker |
| TX | Primární nádor nelze hodnotit |
| T0 | Bez známek primárního nádoru |
| Ta | Neinvazivní papilární karcinom |
| Tis | Karcinom in situ |
| T1 | Nádor postihuje subepiteliální vazivo |
| T2 | Nádor postihuje svalovinu |
| T2a | Nádor postihuje povrchovou svalovinu (vnitřní polovinu tloušťky) |
| T2b | Nádor postihuje hlubokou svalovinu (zevní polovinu tloušťky) |
| T3 | Nádor postihuje perivezikální tkáň |
| T3a | Mikroskopicky |
| T3b | Makroskopicky (extravezikální masy) |

| | |
|--------------|--|
| T4 | Nádor postihuje některou z následujících struktur: stroma prostaty, Semenné vajíčky, dělohu, pochvu, stěnu pánevní, stěnu břišní |
| T4a | Nádor postihuje stroma prostaty, semenné vajíčky, dělohu nebo pochvu |
| T4b | Nádor postihuje pánevní stěnu nebo břišní stěnu |
| UICC | International Union Against Cancer |
| U-katepsin B | katepsin B v moči |
| UP | Uroplakin |
| uPA | Urokinase-type plasminogen activator, Urokinázový aktivátor plasminogenu |
| UTR | Nepřekládaná oblast |

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Obecná patologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, 290 s. ISBN 978-807-2627-738.
- 2 MAČÁK, Jirka a Jana MAČÁKOVÁ. *Patologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. 372 s. ISBN 978-80-247-0785-3.
- 3 KONRÁDOVÁ, Václava, Luděk VAJNER a Jiří UHLÍK. *Histologie: přednášky pro bakalářské studium*. 1. vyd. Jinočany: H, 2005, 186 s. ISBN 80-731-9009-5.
- 4 REJTHAR, Aleš a Bořivoj VOJTĚŠEK. *Obecná patologie nádorového růstu*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002, 206 s. ISBN 80-247-0238-X.
- 5 *TNM Klasifikace zhoubných novotvarů*. 7. vyd. Editor L Sobin, M Gospodarowicz, Christian Wittekind. Chichester: Wiley, 2010, 246 s. ISBN 978-809-0425-965.
- 6 ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika: Laboratorní diagnostika nádorů močového měchýře*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002, s. 484-490. 906 s. ISBN 80-7262-201-3.
- 7 HES, Ondřej a Michal MICHAL. *Nádory močového měchýře*. [online]. [cit. 2013-03-29]. Dostupné z: <<http://www.mechyr.nadory.cz/html/5d3.html>>.
- 8 ZACHOVAL, Roman. *Nádory močového měchýře*. [online]. [cit. 2013-03-02]. Dostupné z: <<http://www.urologieprostudenty.cz/uploads/pdf/nadory-mocoveho-mechyre.pdf>>.
- 9 ADAM, Zdeněk, Jiří VORLÍČEK a Jiří VANÍČEK. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. 2. aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2004. 696 s. ISBN 80-247-0896-5.
- 10 MATOUŠKOVÁ, Michaela. *Nádory močového měchýře*. 2001. Projekt MZ ČR zpracovaný ČLS JEP za podpory grantu IGA MZ ČR 5390-3. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně.

- 11 CASTILLO MARTIN, Mireia. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urologic oncology*. 2010, roč. 28, č. 4, s. 401-408. ISSN 10781439.
- 12 ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika: Nádorové markery*. 1. vyd. Praha: Galén, 2002, s. 379-390. 906 s. ISBN 80-7262-201-3.
- 13 KALOUSOVÁ, Marta. Nádorové markery. [online]. [cit. 2013-03-13]. Dostupné z: <http://ukb.lf1.cuni.cz/ppt/tum_mark.pdf>.
- 14 FELDMAN, Adam. Cystatin B as a tissue and urinary biomarker of bladder cancer recurrence and disease progression. *Clinical cancer research*. 2009, roč. 15, č. 3, s. 1024-31. ISSN 10780432.
- 15 KODÍČEK, Milan. Biochemické pojmy: Výkladový slovník. [online]. [cit. 2013-03-01]. ISBN 978-80-7080-669-2. Dostupné z: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1>.
- 16 VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002, 135 s. ISBN 978-80-200-0600-4.
- 17 HRAŠKA, Marek, Slavomír RAKOUSKÝ a Vladislav ČURN. Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenezi rostlin. *Chemické listy*. 2006, č. 100, s. 501-507. ISSN 12137103.
- 18 KOTYZA, Jaromír, KŘEPELA, Evžen. Proteases and antiproteases in health and disease - a review. 3. Cysteine proteases and their natural inhibitors. *Biomarkers and environment*. 2002, roč. 5, č. 1, s. 2-17. ISSN 12118869.
- 19 MASOPUST, Jaroslav. Extracelulární matrix. [online]. [cit. 2013-03-29]. Dostupné z: <<http://dotdiag.cz/img/prednasky/em.pdf>>.
- 20 YAN, Shiqing *et al.*. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biological Chemistry*. 2003, roč. 384, č. 6, s. 845-54. ISSN 14316730.

- 21 ROSHY, Stefanie. Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2003, roč. 22, č. 2, s. 271. ISSN 01677659.
- 22 The European Bioinformatics Institute: Part of the European Molecular Biology Laboratory [online]. [cit. 2013-04-10]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/1csb_cbc600.png>.
- 23 MORT, John. Cathepsin B. *International journal of biochemistry & cell biology*. 1997, roč. 29, č. 5, s. 715-720. ISSN 13572725.
- 24 KOTASKA, Karel *et al.* Urine and Serum Cathepsin B Concentrations in the Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2012, roč. 26, č. 2, s. 61-65. ISSN 08878013.
- 25 BERQUIN, Isabelle *et al.* Cathepsin B expression in human tumors. *Advances in experimental medicine and biology*. 1996, roč. 389, s. 281-94. ISSN 00652598.
- 26 The Quantikine Human Pro-Cathepsin B Immunoassay. [online]. [cit. 2013-04-09]. Dostupné z: <<http://www.rndsystems.com/pdf/dcatb0.pdf>>.
- 27 Imunochemické metody. [online]. [cit. 2013-04-09]. Dostupné z: <<http://chel.lf1.cuni.cz/html/imuno.pdf>>.
- 28 LAŠŤOVIČKA, Jan. Imunoreakce se značenými protilátkami. [online]. [cit. 2013-04-09]. Dostupné z: <http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/imunoreakce.pdf>.
- 29 KOTAŠKA, Karel, JEDLIČKOVÁ, Blanka, PRŮŠA, Richard. Je stanovení sérového kreatininu vždy věrohodné? Úskalí preanalytické fáze. *Časopis lékařů českých*. 2008, roč. 146, č. 7, s. 392-395. ISSN: 00087335.
- 30 KOTAŠKA, Karel. Stanovení katepsinu B v séru a v moči u pacientů s karcinomem močového měchýře. In: [online]. [cit. 2013-04-19]. Dostupné z: <http://web2.stapro.cz/fons/prednasky/5_2.pdf>.
- 31 EIJÁN, Ana. High expression of cathepsin B in transitional bladder carcinoma correlates with tumor invasion. *Cancer*. 2003, roč. 98, č. 2, s. 262-268. ISSN 0008543X.

- 32 HOPKINS, SC, Ford KS, Soloway MS. Invasive bladder cancer: Support for screening. *The Journal of Urology*. 1983, roč. 130, č. 1, s. 61-64. ISSN 00225347.
- 33 ENG, C, Cunningham D, Quade BJ, Schwamm L, Kantoff PW, Skarin AT. Meningeal carcinomatosis from transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*. 1993, roč. 72, č. 2, s. 553-557. ISSN 0008543X.
- 34 STAACK, A, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Loening SA, Schnorr D, Jung K. Cathepsins B, H, and L activities in urine of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2002, roč. 59, č. 2, s. 308-312. ISSN 00904295.
- 35 SVATEK, RS, Karam J, Karakiewicz PI, Gallina A, Casella R, Roehrborn CG, Shariat SF. Role of urinary cathepsin B and L in the detection of bladder urothelial cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 2008, roč. 179, č. 2, s. 478-484. ISSN 00225347.
- 36 STAACK, Andrea. Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2004, roč. 63, č. 6, s. 1089-1094. ISSN 00904295.
- 37 UEDA, M. A study on cathepsin B-like substance in patients with urological cancer. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*. 1993, roč. 84, č. 2, s. 355-63. ISSN 00215287.