

UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Hradci Králové



DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Petr Hušek

2020

Doktorský studijní program

Chirurgie

**Změny v metylaci DNA jako potenciální biomarkery
v léčbě karcinomu močového měchýře**

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

MUDr. Petr Hušek

Školitel: doc. MUDr. Jaroslav Pacovský, Ph. D.

Školitelka konzultantka: Mgr. Marcela Chmelařová, Ph. D.

Hradec Králové 2020

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem tuto doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační a přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové, 2020 MUDr. Petr Hušek

Poděkování

Úvodem bych rád poděkoval doc. MUDr. Jaroslavu Pacovskému, Ph. D. a Mgr. Marcele Chmelařové, Ph. D. za vedení mé výzkumné práce, ochotu, vstřícnost a čas, který byli ochotní věnovat mé vědecké aktivitě.

Dále děkuji prof. MUDr. RNDr. Milanu Kaškovi, Ph. D., proděkanu pro doktorské studijní programy a výuku bakalářských programů za odborné vedení během mého postgraduálního studia a pomoc při přípravě disertační práce.

Velké poděkování patří též prim. MUDr. Miroslavu Podholovi, Ph. D. za ochotu při vyhledávání a zpracování histologických vzorků a dodání obrazové dokumentace.

Děkuji vedení Urologické kliniky FNHK a všem kolegům za umožnění přípravy této disertační práce.

Tato práce vznikla za podpory grantu MH CZ – DRO (UHHK, 00179906).

Obsah

Obsah.....	5
Seznam použitých zkratk.....	8
1. Úvod do problematiky karcinomu močového měchýře.....	11
1.1. Epidemiologie	11
1.2. Etiologie.....	14
1.3. TMN klasifikace.....	15
1.4. Histologie.....	19
1.5. Diagnostika.....	22
1.6. Léčba.....	25
1.6.1. NMIBC.....	25
1.6.2. Léčba selhání konzervativní léčby NMIBC, CIS a MIBC.....	29
1.7. BCG vakcína.....	36
1.7.1. Historie BCG vakcíny.....	36
1.7.2. Mechanismus účinku BCG vakcíny.....	41
1.7.3. Indikace, účinnost a dávkování BCG vakcíny.....	42
1.7.4. Neúspěch léčby BCG vakcínou.....	43
1.7.5. Komplikace BCG léčby.....	44

1.8. Epigenetika.....	47
1.8.1. Epigenetické mechanismy (obecně).....	47
1.8.2. DNA metylace.....	48
1.8.3. Acetylace histonů (post-translační modifikace histonových proteinů).....	48
1.8.4. MikroRNA (umlčování transkripce genů).....	48
2. Cíle.....	49
3. Výzkumná část.....	50
3.1. Úvod.....	50
3.2. Retrospektivní zhodnocení výsledků léčby u pacientů s <i>high grade</i> NMIBC a CIS močového měchýře, kteří absolvovali BCG instalační terapii.....	51
3.2.1. Cíl.....	51
3.2.2. Soubor a metoda.....	51
3.2.3. Výsledky.....	52
3.2.4. Závěr.....	54
3.3. Studium epigenetických změn ve tkáni <i>high grade</i> NMIBC a CIS.....	55
3.3.1. Cíl.....	55
3.3.2. Soubor a metoda.....	55
3.3.3. Výsledky.....	62
3.3.4. Závěr.....	62

3.4. Hledání epigenetického markeru predikujícího léčebnou odpověď BCG vakcíny v léčbě <i>high grade</i> NMIBC a CIS.....	63
3.4.1. <i>Cíl</i>	63
3.4.2. <i>Soubor a metoda</i>	63
3.4.3. <i>Výsledky</i>	64
3.4.4. <i>Závěr</i>	68
3.5. <i>Diskuze</i>	69
4. Seznam použité literatury	73

Seznam použitých zkratek

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

APC - Adenomatous polyposis coli

BAL - bronchoalveolární laváž

BCG - bacillus Calmette-Guerin

BLC2 - B-cell CLL/lymphoma 2

BTA - bladder tumour antigen

CD - cluster of differentiation

CDH13 - Cadherin 13, H-cadherin

CDK - Cyclin-dependentní kináza

CDKN2B - Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B

CIS - karcinoma in situ

CpG - cytosin-fosfát-guanin

CT - počítačová tomografie

CT-IVU - počítačová tomografie s vylučovací fází

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EORTC - European Organisation for Research and Treatment of Cancer

FISH - fluorescence in situ hybridization

GATA4 - GATA binding protein 4

GM-CS - granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HhaI - restriction endonuclease from Haemophilus haemolyticus

IFN - interferon

IL - interleukin

JIP - jednotka intenzivní péče

MIDC - muscle invasive bladder cancer

MSH6 - mutS homolog 6 (E. coli)

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

MUS81a - MUS81 endonuclease homolog

NAT2 - N -acetyl transferazy 2

NBI - narrow-band imaging

NMIDC - non muscle invazive bladder cancer

NSAID - non-steroidal anti-inflammatory drugs

NTRK1 - Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1

NK - natural killer

PCCA - Propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide

PCR - polymerázová řetězová reakce

PDD - photo-dynamic diagnosis

PMF-1 - polyamide-modulated factor-1

PTEN - Phosphatase and tensin homolog

PUNLMP - papilární léze s nízkým maligním potenciálem

RASSF1 - Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1

RNA - ribonukleová kyselina

SFRP1 - Secreted frizzled-related protein 1

TERT - Telomerase reverse transcriptase

TH - T-lymphocyte helper

THBS1 - Thrombospondin 1

TNF - tumor necrosis factor

TP73 - Tumor protein p73

TURT - transuretrální resekce tumoru

TWIST1 - Twist homolog 1

UZ - monografie

VIP - Vesica ileale Padovana

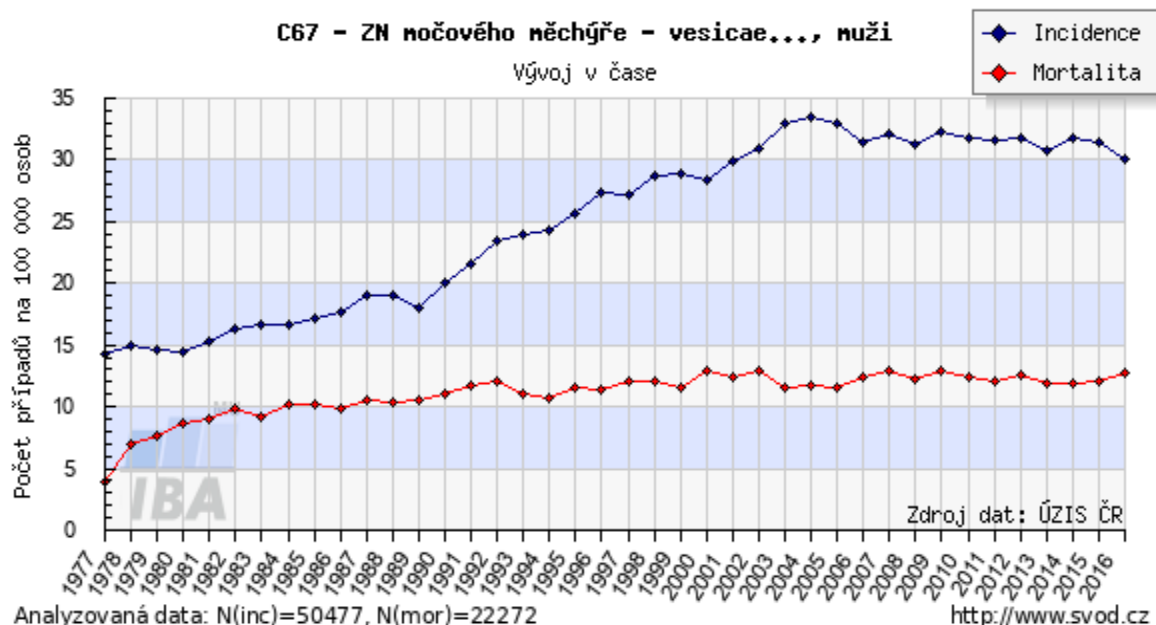
WIF1 - WNT inhibitory factor 1

1. Úvod do problematiky karcinomu močového měchýře

1.1. Epidemiologie

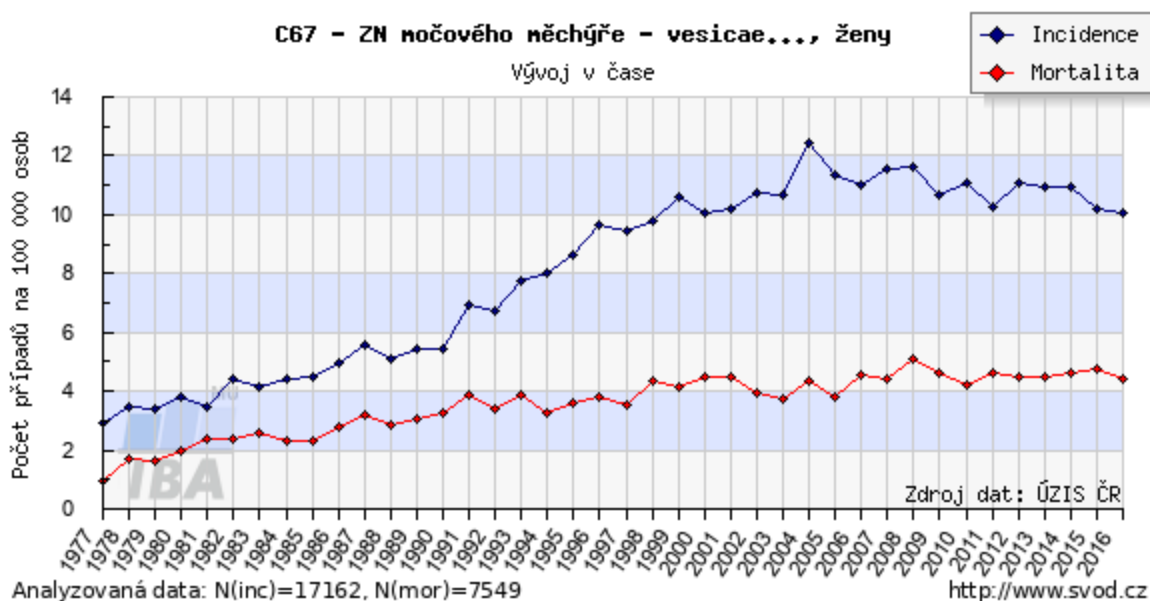
Karcinom močového měchýře je sedmou nejčastěji diagnostikovanou malignitou mužů na světě a jedenáctou u obou pohlaví dohromady¹. Muži jsou touto malignitou postiženi 2,8x častěji než ženy^{2,3}. Jedná se o onemocnění vyššího věku, 2/3 případů se vyskytují u pacientů starších 65 let⁴. Celosvětově incidence dosahuje 9,0/100000 mužů a 2,2/100000 u žen. V Evropské unii je incidence vyšší v porovnání s celosvětovým průměrem 19,1/100000 u mužů a 6,2/100000 u žen¹. V ČR v roce 2016 dosahovala hodnoty 30,0/100000 u mužů, respektive 10,0/100000 u žen⁵. Ve stejném roce se mortalita u karcinomu močového měchýře pohybovala na úrovni 12,8/100000 u mužů a 4,4 /100000 u žen⁵ (Graf 1 a 2).

Graf 1: Trendy ve vývoji incidence a mortality u karcinomu močového měchýře u mužů

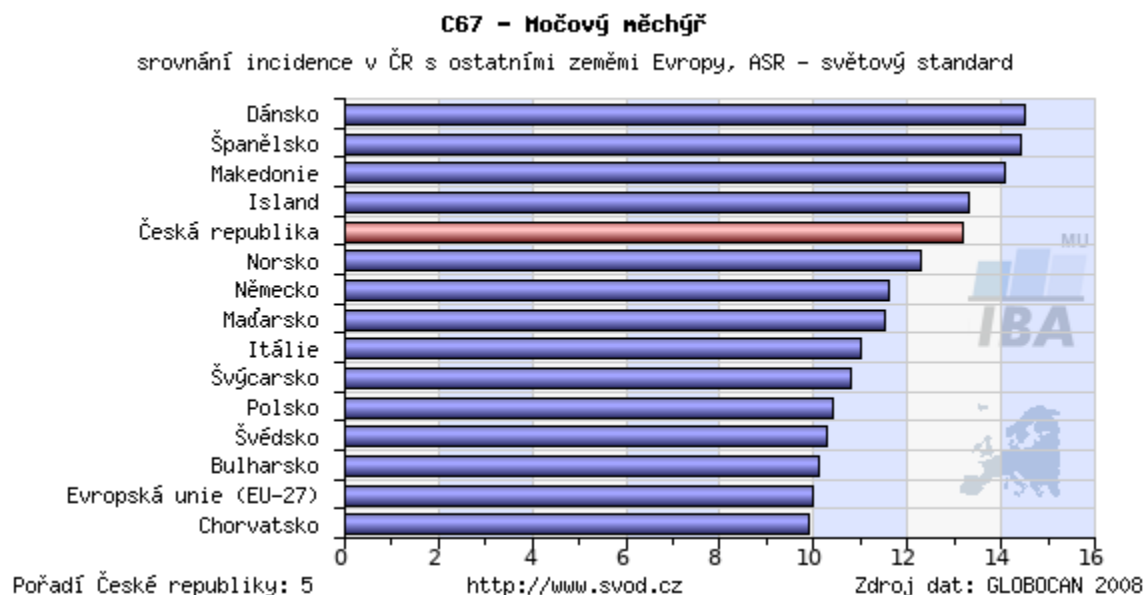


V absolutních číslech se jednalo o úmrtí 665 mužů a 237 žen na karcinom močového měchýře⁵. V porovnání s ostatními regiony patří Česká republika k zemím s nejvyšším výskytem karcinomu močového měchýře nejen v rámci EU, ale i celosvětově. S naší celkovou incidencí 13,2/100000 obyvatel jsme na 5. místě v EU a 8. místě v celosvětovém porovnání⁵ (Graf 3 a 4). V době diagnózy je průměrně 75 % nádorů ve stadiu do svalů neinvadujícího nádoru stádia Ta, T1 či *carcinoma in situ* (CIS)⁶. Nádory stadia T2-T4, tedy již s invazí do svaloviny močového měchýře či dokonce do okolních orgánů mají ve srovnání s první skupinou výrazně horší prognózu stran přežití¹.

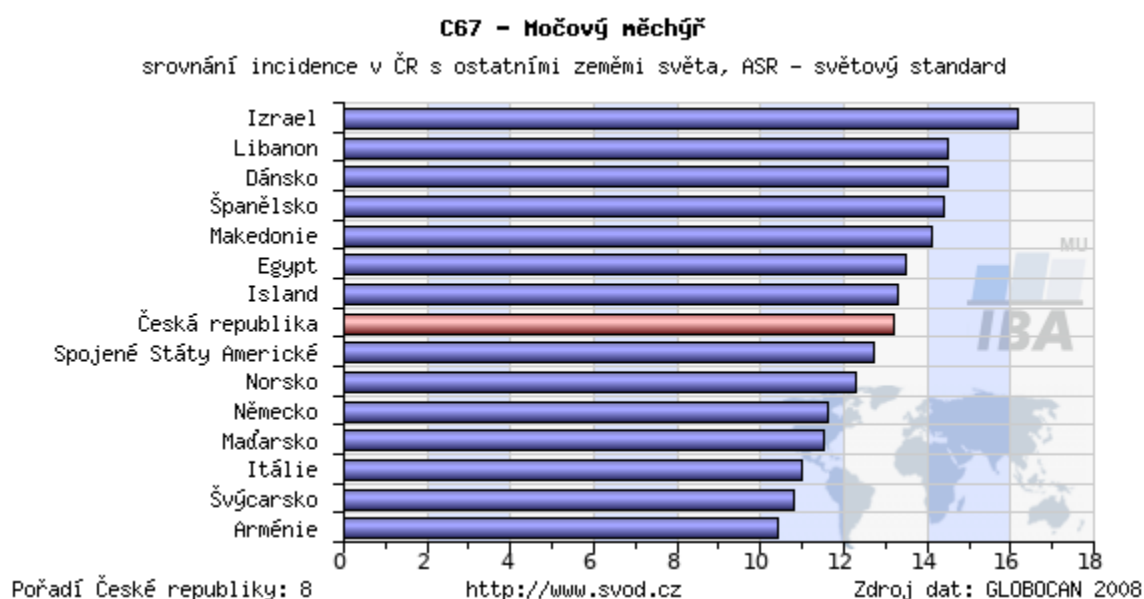
Graf 2: Trendy ve vývoji incidence a mortality u karcinomu močového měchýře u žen



Graf 3: Porovnání výskytu karcinomu močového měchýře v rámci EU



Graf 4: Porovnání výskytu karcinomu močového měchýře celosvětově



1.2. Etiologie

Karcinom močového měchýře je malignita výrazně ovlivněna zevními vlivy. Incidence stoupá s rozvojem průmyslu a znečištěním zevního prostředí². Kouření je jednoznačně nejvýraznějším etiologickým faktorem jeho výskytu^{7,8}. Kolem 50 % pacientů s nádorem močového měchýře jsou kuřáci^{9,10}. Pravděpodobnost výskytu karcinomu močového měchýře u kuřáka je 2-4x větší, než u nekuřáka⁴. Dalším prokázaným rizikovým faktorem jsou profesionální expozice, které odpovídají za cca 10 % případů. Jedná se například o aromatické aminy přítomné v anilínových barvivech a dalších chemických látkách. Dále se jedná o polycyklické aromatické uhlovodíky^{2,9}. Mezi nejrizikovější obory patří textilní a gumárenský průmysl. Ve vyšším riziku výskytu karcinomu močového měchýře jsou i pracovníci kožedělného a tiskařského průmyslu, při výrobě a nakládání s barvami, malíři, kadeřníci, řidiči nákladních automobilů^{2,11}. Jako rizikovým faktorem pro vznik karcinomu močového měchýře se zdá být i přítomnost arzenu v pitné vodě a vedlejší produkty vzniklé chlorováním vody^{8,12}. Mezi léky spojené s vyšším výskytem karcinomu močového měchýře patří cyklofosamid, chlornafazin a analgetika obsahující fenacetin^{4,9}. Dále byl pozorován vyšší výskyt karcinomu močového měchýře u pacientů, kde je měchýř vystaven chronickému dráždění. Jedná se zejména o pacienty s schistomoniázou, chronickou litiázou či dlouhodobě zavedeným močovým katetrem. V těchto případech se jedná většinou o spinocelulární variantu karcinomu^{8,9}. Familiární výskyt karcinomu močového měchýře nebyl signifikantně prokázán¹³. Jen geneticky polymorfismus v aktivitě enzymu N-acetyl transferázy 2 (NAT2) v kombinaci s kouřením či profesionální expozici ukázal zvýšené riziko výskytu karcinomu močového měchýře¹⁴. Dalším prokázaným rizikovým faktorem je ionizující záření, zejména na oblast malé pánve v souvislosti s léčbou karcinomu děložního čípku a endometria u žen nebo léčby karcinomu prostaty u mužů^{7,9}. V rámci známých studií, látky jako umělá sladidla, káva, čaj, alkohol, neprokázaly vztah s výskytem karcinomu močového měchýře. Nejeftektivnější prevencí je vyvarování se kouření a eliminace expozice dalšími rizikovými faktory. Jako prospěšné se jeví zvýšený přísun tekutin, konzumace čerstvého ovoce, zeleniny, omezení tučných a smažených jídel, dostatečný přísun vitamínů A, C, E, selenu, B6².

1.3. TMN klasifikace

Pro klasifikaci nádorů močového měchýře je zásadní přítomnost či absence invaze do svaloviny močového měchýře. Nádory postihující sliznici či *lamina propria* označujeme jako neinfiltrativní (NMIBC- *non muscle invazive bladder cancer*) (Obr. 1 a 2).

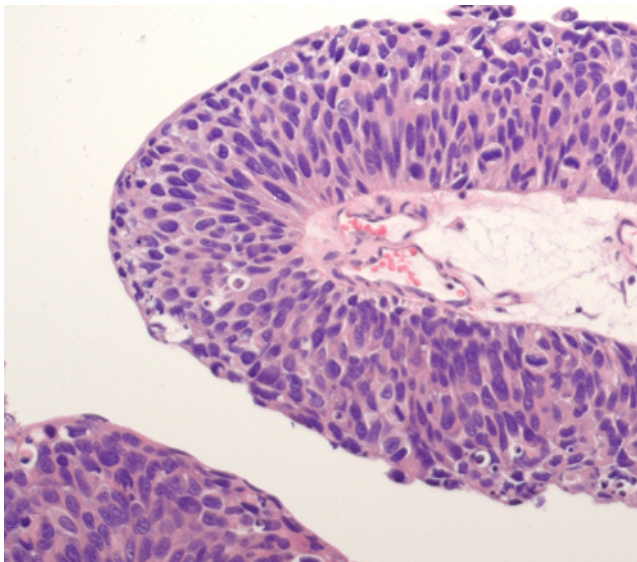
Obr. 1: NMIBC- *High grade* karcinom – endoskopický pohled

(Zdroj: archiv Urologická klinika FNHK)



Obr. 2: NMIBC- *High grade* karcinom – mikroskopický obraz

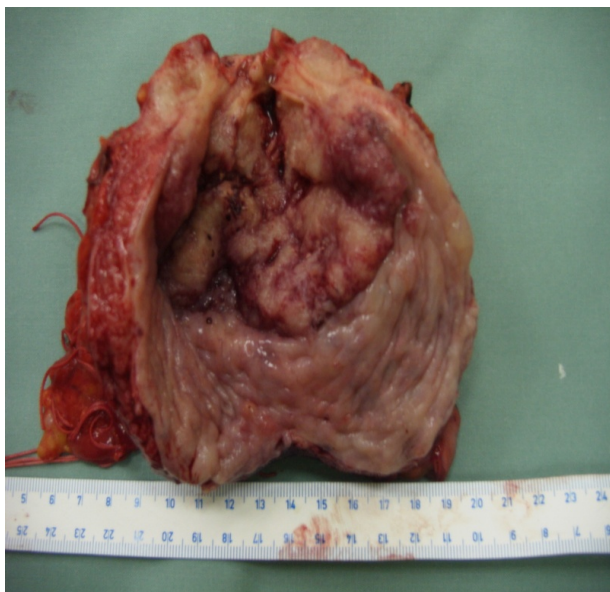
(Zdroj: prim. MUDr. M. Podhola, Ph.D. - FÚP FNHK)



Nádory rostoucí do svaloviny močové měchýře pak označujeme jako infiltrativní (MIBC – *muscle invasive bladder cancer*) (Obr. 3 a 4).

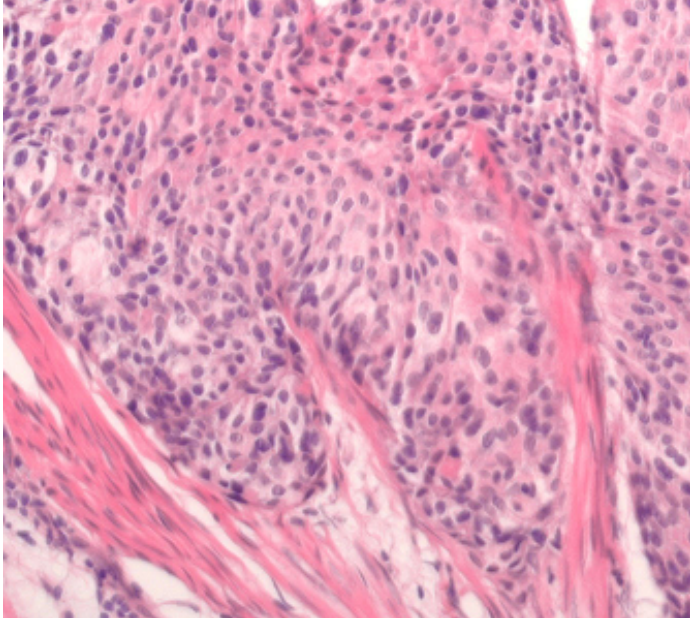
Obr. 3: Invazivní karcinom - histologická preparát

(Zdroj: archiv Urologická klinika FNHK)



Obr. 4: Invazivní karcinom – mikroskopický obraz

(Zdroj: prim. MUDr. M. Podhola, Ph.D. - FÚP FNHK)



Mezi těmito skupinami nádorů je významný rozdíl, jak v léčebné strategii, tak v prognóze onemocnění. TNM klasifikace tumoru močového měchýře je uvedena v tabulce (Tab. 1.)¹⁵.

Tab. 1: TNM klasifikace nádorů močového měchýře

T - primární tumor		
Tx		Primární tumor nelze posoudit
T0		Bez známek primárního tumoru
Tis		<i>carcinoma in situ</i> , plošný tumor
Ta		Neinvazivní tumor
T1		Nádor se šíří do subepiteliální pojivové tkáně
T2		Nádor postihující svalovinu
	T2a	Nádor se šíří do povrchové svaloviny (vnitřní polovina)
	T2b	Nádor se šíří do hluboké svaloviny (vnější polovina)
T3		Nádor postihující perivezikální tkáň
	T3a	mikroskopicky
	T3b	makroskopicky
T4		Šíření do okolních orgánů
	T4a	Šíření do prostaty, pochvy, dělohy
	T4b	Infiltrace pánevní či břišní stěny
N – regionální lymfatické uzliny		
Nx		Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0		Bez metastáz v regionálních lymfatických uzlinách
N1		Metastatické postižení jedné pánevní uzliny (obturatorní, hypogastrické, presakralní, vnitřní iliické)
N2		Metastatické postižení více pánevních uzlin (obturatorní, hypogastrické, presakralní, vnitřní iliické)
N3		Metastatické postižení uzlin podél společných ilik
M - vzdálené metastázy		
M0		Bez vzdálených metastáz
M1a		Metastázy v neregionálních lymfatických uzlinách
M1b		Přítomnost vzdálených metastáz

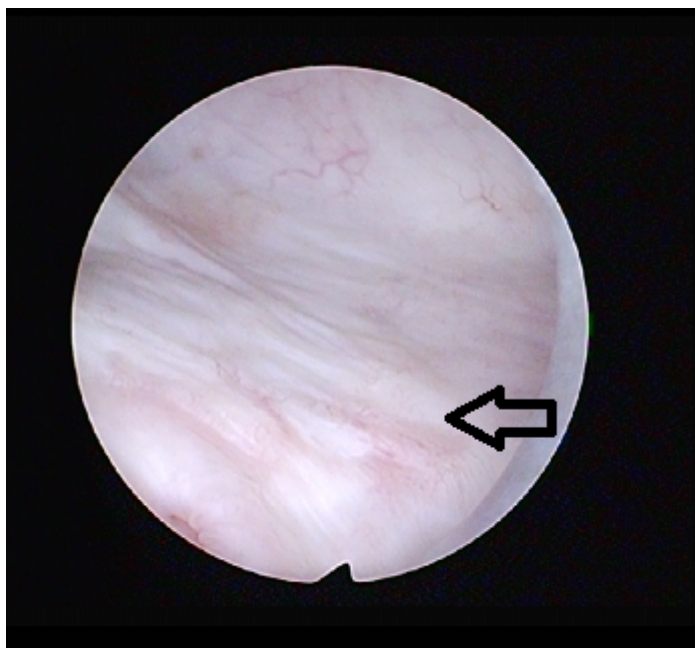
1.4. Histologie

Histologicky se ve více než 90% případů nádorů močového měchýře jedná o uroteliální karcinom. Vzácně se může vyskytnout i spinocelulární karcinom (2,5 %), adenokarcinom (1,5 %), raritně malobuněčný karcinom¹⁶.

Původní WHO histologická klasifikace *gradu* tumoru z roku 1973 byla upravena v roce 2004 (Tab. 2 a 3)¹⁷⁻¹⁹. Velmi zákeřnou a obávanou histologickou podskupinou NMIBC je *carcinoma in situ* (Obr. 5 a 6).

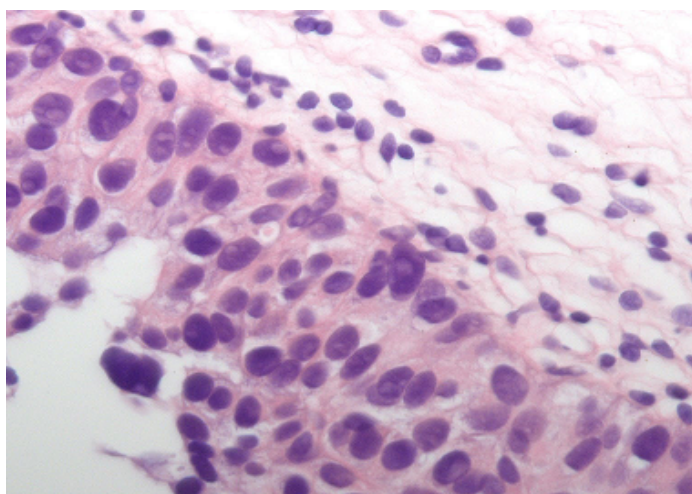
Obr. 5: *Carcinoma in situ* – endoskopický pohled

(Zdroj: archiv Urologická klinika FNHK)



Obr. 6: Carcinoma in situ – mikroskopický obraz

(Zdroj: prim. MUDr. M. Podhola, Ph.D. - FÚP FNHK)

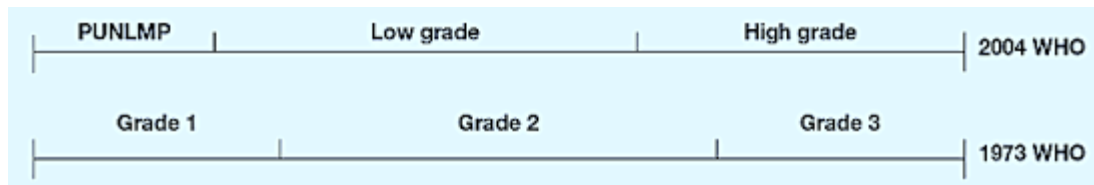


Jedná se vždy o *high grade*, plošné, plazivé postižení sliznice močového měchýře, které může být snadno přehlédnuto při běžném cystoskopickém vyšetření nebo může imitovat zánětlivé změny sliznice močového měchýře²⁰. Pokud je *carcinom in situ* neléčen, až v 54 % pacientů přechází v invazivně rostoucí karcinom²¹. *Carcinom in situ* může být primární, kdy se vyskytuje izolovaně bez přítomnosti papilárního tumoru. Sekundární CIS se vyskytuje až v průběhu sledování u pacientů s tumorem močového měchýře. Konkuretní CIS se vyskytuje v močovém měchýři současně s jinou formou nádoru močového měchýře²².

Tab. 2: WHO histologicky *grade* nádoru močového měchýře 1973 a 2004

1973 WHO <i>grading</i>
<i>Grade 1</i> : dobře diferencovaný tumor
<i>Grade 2</i> : středně diferencovaný tumor
<i>Grade 3</i> : špatně diferencovaný tumor
2004 WHO <i>grading</i>
Papilární léze s nízkým maligním potenciálem (PUNLMP)
<i>Low-grade</i> papilární karcinom
<i>High-grade</i> papilární karcinom

Tab. 3: WHO histologický *grade* 1973 a 2004

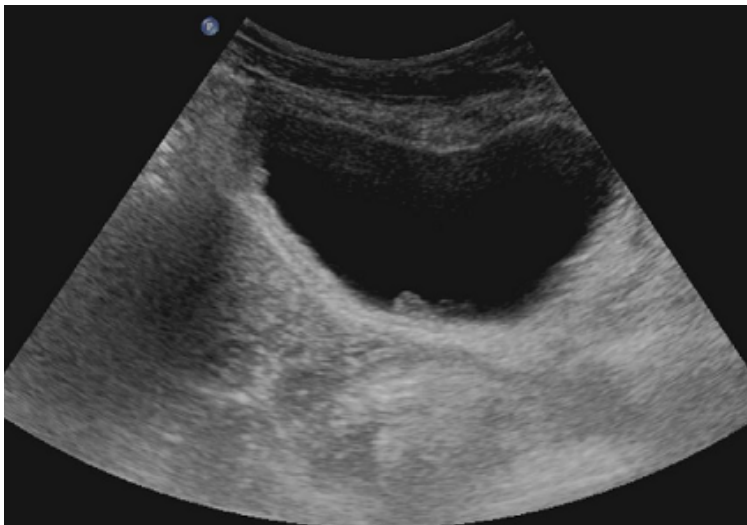


1.5. Diagnostika

Diagnostika karcinomu močového měchýře je založena na klinických symptomech a zobrazovacích a endoskopických vyšetřeních. Nejčastějším klinickým nálezem je mikroskopická či makroskopická hematurie. Jinak u NMIBC je symptomatika velmi chudá. U nádorů postihující hrdlo močového měchýře či CIS se objevují iritační mikční obtíže. Ze zobrazovacích metod u pacientů s hematurií je základním vyšetřením sonografie močových cest (UZ). Ultrazvukem lze detekovat intraluminální expanzi v močovém měchýři, či patologicky zesílenou stěnu močového měchýře, zároveň je vždy nezbytné posoudit i stav horních močových cest (Obr. 7).

Obr. 7: Ultrazukový obraz drobného exofytického tumoru močového měchýře

(Zdroj: archiv Urologická klinika FNHK)



Mezi vyšetření močových cest s užitím kontrastní látky patří počítačová tomografie (CT) či vylučovací urografie IVU. V době běžně dostupného CT vyšetření včetně možnosti vylučovací (CT-IVU) je prostá IVU již obsolentní²³. Mimo samotné zobrazení močových cest, CT vyšetření umožňuje i zhodnocení stavu lymfatických uzlin a stavu okolních orgánů (Obr. 8). Alternativou CT vyšetření je magnetická rezonance (MR).

Obr. 8: CT obraz objemného tumoru močového měchýře

(Zdroj: archiv Urologická klinika FNHK)



Nezastupitelnou roli v diagnostice karcinomu močového měchýře hraje cystoskopické vyšetření s možností odběru tkáně k histologickému zpracování. Cytologické vyšetření moče či výplachu močového měchýře má dobrou senzitivitu pouze u *high grade* tumoru (84 %) či CIS (30-100 %). U *low grade* nádoru je naopak senzitivita toho vyšetření velmi nízká (16 %) ²⁴. Cytologie je tedy vhodná spíše jako doplnění cystoskopického vyšetření, neslouží jako primární diagnostická metoda ²⁵. Cytologické vyšetření může být nápomocno v diagnostice CIS, který může být cystoskopicky snadno přehlédnut ²⁶. Dále je uplatněno při sledování pacientů s *high grade* karcinomem močového měchýře ²⁷.

Nádorové markery jsou jistě budoucností diagnosticky a sledování pacientů s karcinomem močového měchýře. Ze známých nádorových markerů zatím bohužel žádný nedosáhl takové senzitivity či specificity, aby mohl být využit v běžné klinické praxi či se dostat do standardů Evropské Urologické Společnosti. V tabulce jsou uvedeny markery s nejlepšími výsledky ²⁸⁻³⁰ (Tab. 4).

Tab. 4: Nádorové markery nadějně v diagnostice karcinomu močového měchýře

(Zdroj: Guidelines EAU)

Marker	Sensitivita (%)	Specifická (%)	Sensitivita pro <i>high grade</i> tumor (%)	Stupeň doporučení
Urovysion (FISH)	30-86	63-95	66-70	2b
Analýza mikrosatelitů	58-92	73-100	90-92	1b
Immunocyt/uCyt+	52-100	63-79	62-92	2a
Nuclear matrix Protein 22	47-100	55-98	75-92	2a
BTA stat	29-83	56-86	62-91	3
BTA TRAK	53-91	28-83	74-77	3
Cytokeratiny	12-88	73-95	33-100	3

1.6. Léčba

1.6.1. NMIBC

Léčba NMIBC je založena na snaze o kompletní odstranění tumoru. Tumor může být resekován po fragmentech či metodou *en -bloc* resekce. Každá endoresekce by měla být provedena dostatečně hluboko s přítomností svaloviny detruzoru ve vzorku, tak aby patolog mohl jednoznačně vyloučit invazně rostoucí tumor močového měchýře³¹.

K provedení samotného výkonu lze použít monopolární či bipolární resektoskop (Obr. 9 a 10).

Obr. 9: Endoskopický resektoskop

(Zdroj: archiv Urologická klinika FNHK)



Obr. 10: Resekce tumoru močového měchýře - endoskopický pohled

(Zdroj: archiv Urologická klinika FNHK)



Jako výhoda bipolárního přístroje je uváděno nižší riziko perforačních komplikací způsobeným nežádoucí kontrakcí adduktorů dolních končetin v důsledku stimulace obturatorního nervu. Dále je uváděno menší termické poškození dodané tkáně, což usnadňuje práci patologa³². Časná sekundární endoresekce je doporučována do 2-6 týdnů v případech inkompletní primární endoresekce, nepřítomnosti svaloviny detruzoru ve vzorku či T1 tumoru a CIS v primární endoresekci.

Ve snaze o maximální záchyt a odstranění i drobných či špatně viditelných nádorových lézí v běžném bílém světle jsou vyvíjeny nové techniky vizualizace tumoru. Mezi tyto technologie patří fluorescenční diagnostika (*photo-dynamic diagnosis*, PDD). Do močového měchýře se jednu hodinu před samotným výkonem aplikuje roztok obsahující hexoaminolevulovou kyselinu. Tato látka je akumulována v tkáních s vysokým metabolickým obratem, jako je právě tkáň nádoru. S odstupem 60 minut po aplikaci roztoku intravenózně se při použití modrého světla o vlnové délce 375-440 nm zvýrazní nádorová tkáň z důvodu červené fluorescence³⁴. V porovnání PDD s cystoskopií pouze v bílém světle se senzitivita vyšetření zvýšila ze 71% na 92% a specificita z 63 % na 81 %³⁵. Zejména pak detekce CIS se zvýšila až o 40 %³⁶. NBI (*narrow-band imaging*) je další metodou ve snaze o zlepšení diagnostiky nádorové tkáně. Tato metoda tzv. modrého světla využívá barevného odlišení hypervaskularizované nádorové tkáně pokud je užito světlo určité vlnové délky (415 a 540 nm) procházející resektoskopem³⁷.

Nádory močového měchýře mají tendenci k recidivě a progresi onemocnění. Individuální pravděpodobnost recidivy či progresu onemocnění se dá odhadnout pomocí EORTC *Genito-Urinary Cancer Group* skórovacího systému (Tab. 5). Tento odhad vývoje onemocnění pomáhá následně stratifikovat adjuvantní terapii navazující na samotnou kompletní endoresekcii tumoru. Adjuvantní léčba *NMIBC* spočívá v léčbě intravezikální chemoterapií či *BCG* vakcínou.

Intravezikální chemoterapie spočívá v aplikaci mitomycinu-C (epirubicin, doxorubicin méně častěji) do močového měchýře. Jako nejefektivnější se jeví okamžitá jednorázová aplikace do 24 h (nejlépe do 2 h) po provedené endoresekcii s cílem zničit cirkulující nádorové buňky a reziduální nádorové buňky v močovém měchýři po endoresekcii³⁸. Užívání následné intravezikální chemoterapie je spojena s problematikou nejasného dávkování a doby trvání léčby. Smysluplná se zdá jen u nízké rizikových pacientů, kde snižuje pravděpodobnost recidivy³⁹.

Intravezikální BCG instilační terapie je zejména určena pro vysoce rizikové pacienty s *high grade* tumorem a CIS. Této problematice je dále věnována samostatná kapitola.

Následná dispenzarizace spočívá v pravidelných cystoskopických kontrolách, které jsou doživotní. Četnost cystoskopických vyšetření je závislá na rizikovosti pacienta. U pacientů s *high grade* tumory a CIS by cystoskopické kontroly měly být spojeny s cytologickým vyšetřením moče²⁷. Jednou ročně by pacienti měli absolvovat i vyšetření horních močových cest, pro vysoké riziko výskytu nádoru na horních močových cestách zejména vysoce rizikových pacientů⁴⁰.

Tab. 5: EORT (European Organization for Research and Treatment of Cancer) nomogram k učení rizika recidivy/progrese nádoru měchýře

(Zdroj: zdravi.euro.cz)

Faktor	Recidivy	Progrese	
Počet			
solitární	0	0	
2 až 7	3	3	
více než 8	6	3	
Velikost			
do 3 cm	0	0	
nad 3 cm	3	3	
Primo/rec			
primozáchyť	0	0	
do roku	4	2	
po roce	2	2	
Invaze			
Ta	0	0	
T1	1	4	
CIS			
ne	0	0	
ano	1	6	
Grade			
G1	0	0	
G2	1	0	
G3	2	5	
Celkové skóre	0 až 17	0 až 23	
Skupina			
Skóre recidiv	1 rok	5 let	
I	0	15 % (10–19 %)	31 % (24–37 %)
II	1–4	24 % (21–26 %)	46 % (42–49 %)
III	5–9	38 % (35–41 %)	62 % (58–65 %)
IV	10–17	61 % (55–67 %)	78 % (73–84 %)
Skupina			
Skóre progrese	1 rok	5 let	
I	0	0,2 % (0–0,7 %)	0,8 % (0–1,7 %)
II	2–6	1 % (0,4–1,6 %)	6 % (5–8 %)
III	7–13	5 % (4–7 %)	17 % (14–20 %)
IV	14–23	17 % (10–24 %)	45 % (35–84 %)

1.6.2. Léčba selhání konzervativní léčby NMIBC, CIS a MIBC

Základem léčby selhání konzervativní léčby NMIBC či CIS a pacientů s MIBC je radikální cystektomie. Tedy odstranění celého močového měchýře se spádovými uzlinami. U mužů je dále spojena s odstraněním prostaty a semenných váčků, u žen s odstraněním gynekologických orgánů, při postižení sliznice uretry je součástí výkonu i uretrektomie (Obr. 11).

Obr. 11: Pacient po roboticky asistované radikální cystektomii a sec. Bricker –

3. pooperační den

(Zdroj: archiv Urologická klinika FNHK)



Nezbytnou součástí výkonu je následné zajištění derivace moče. Je zjevné, že se jedná o rozsáhlý, pacienta výrazně mutilující výkon se závažnými dopady na následnou kvalitu života. Výkon je spojen s častou pooperační morbiditou okolo 30 % a nezanedbatelnou pooperační mortalitou okolo 4 %⁴¹.

Výkon je prováděn klasicky otevřeným způsobem, laparoskopicky či roboticky asistovaný, dle možností a zvyklostí pracoviště. Způsob derivace moče se odvíjí od individuální potřeby pacienta, rozsahu a uložení tumoru či přítomnosti CIS. Derivace moče lze rozdělit do základních skupin: derivace střevním konduitem, ortotopická neovezika, *pouch* s katetrizovatelným stomatem, derivace kontrolovaná análním svěračem, paliativní derivace⁴¹.

Nejčastěji užívanou derivací je střevní kondukt (inkontinentní ureteroileostomie). Tato tzv. Brickerova (modifikace Bricker - Wallace) využívá cca 15-20 cm exkludované kličky terminálního ilea, kdy do proximální části jsou inzerovány oba močovody a distální část je vyšita ke kůži jako stomie. Výhodou této derivace je technická jednoduchost spojená s nižším výskytem pooperačních komplikací. Nevýhoda je doživotní potřeba stomických pomůcek (Obr. 12).

Obr. 12: Derivace moči dle Brickera – ilustrační obrázek

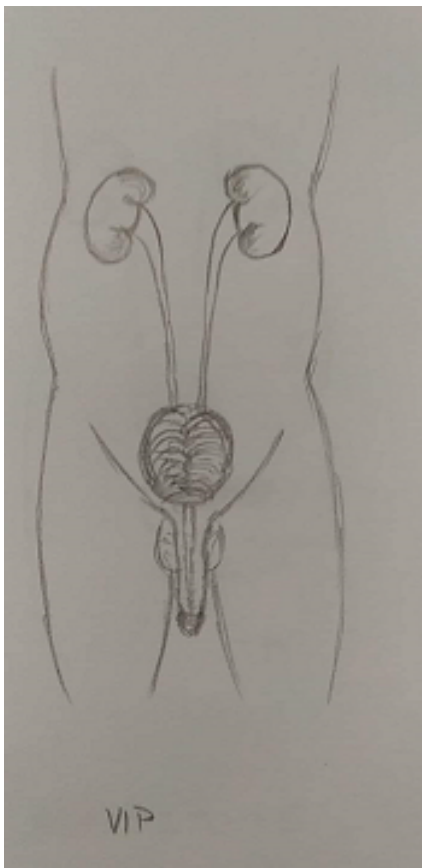
(Zdroj: MUDr. M. Ryšánková Urologická klinika FNHK)



Ortotopická neovezika spočívá ve vytvoření rezervoáru na moč z exkludované a detubulizované části terminálního ilea s využitím vlastní močové trubice a svěrače pacienta. Je celá řada operačních technik vedoucích k tvorbě neovezik (pouchů). Na našem pracovišti je nejčastěji užívanou neovezikou VIP (*Vesica ileale Padovana*) či dle Studera (Obr. 13). Výhodou těchto technik je využití vlastních močových cest, pacienti tedy nepotřebují stomické pomůcky. Nevýhodou jsou časté pooperační komplikace a problémy pacientů s vyprazdňováním neovezik (inkontinence či nutnost autokatetrizace atd.).

Obr. 13: Ortotropická neovezika - VIP – ilustrační obrázek

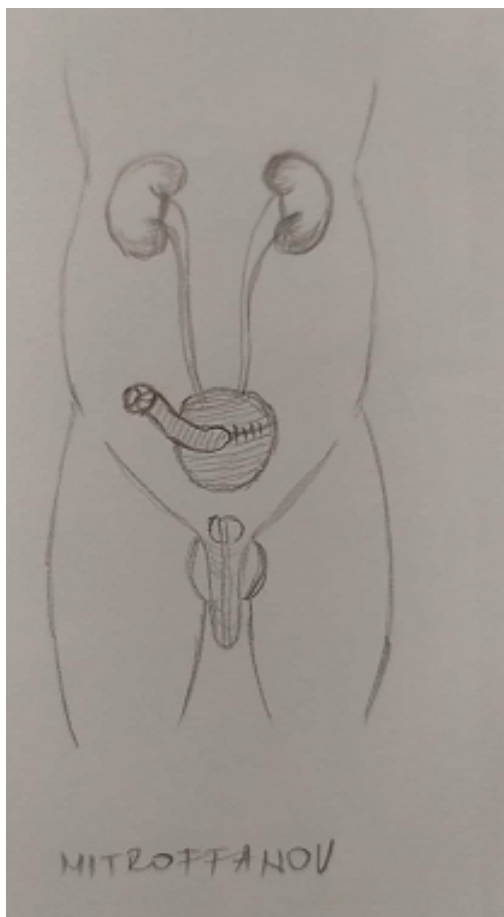
(Zdroj: MUDr. M. Ryšánková Urologická klinika FNHK)



Méně časté jsou pouche s katetrizovatelným stomatem. Jedná se o kontinentní derivace s kutánním samocévkovatelným stomatem. Technika je podobná jako u předchozí derivace, ale místo našíť neveziky na pahýl uretry je vytvořeno malé kutánní cévkovatelné stoma. Vhodné u pacientů, kde je snaha o kontinentní derivaci a není možno využít vlastní močové cesty (Obr. 14).

Obr. 14: Mitrofanoff (pouch s katetrizovatelným stomatem) - ilustrační obrázek

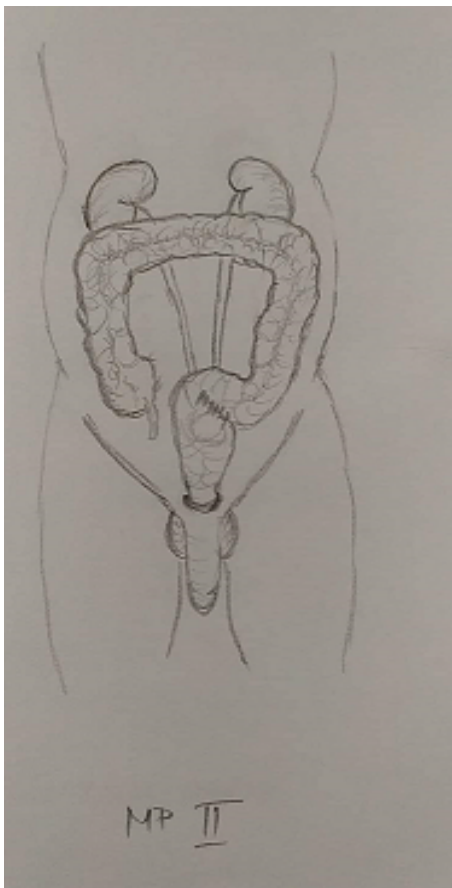
(Zdroj: MUDr. M. Ryšánková Urologická klinika FNHK)



Derivace kontrolovaná análním svěračem (ureterosigmoideostomie). Techniky spočívají ve vytvoření nízkotlakého sigmoideorektálního rezervoáru (např. Mainz pouch II) do něhož jsou implantovány oba močovody. Moč a stolice tedy odchází společně a je kontrolována análním svěračem. Jednoduchá technika, od které se pro velké množství komplikací dnes již ustupuje. Pacienti trpěli opakovanými močovými infekcemi, poruchami acidobazické rovnováhy, inkontinencí stolice atd. (Obr. 15).

Obr. 15: Mainz pouch II (ureterosigmoideostomie) - ilustrační obrázek

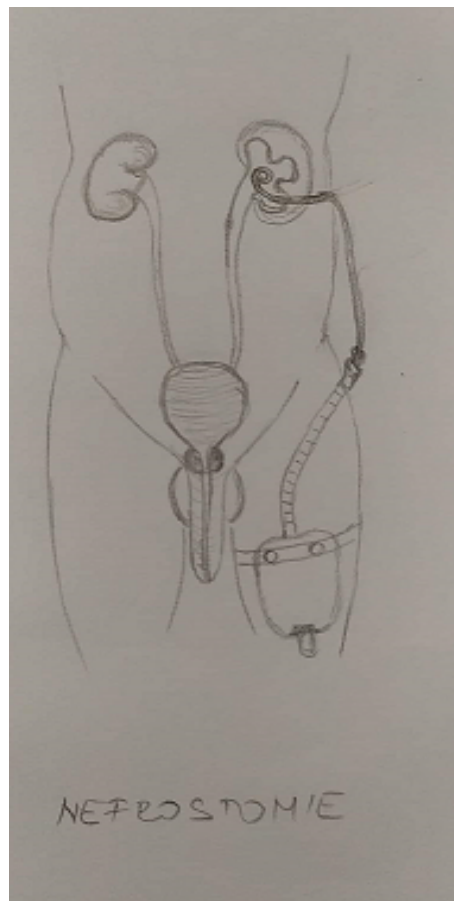
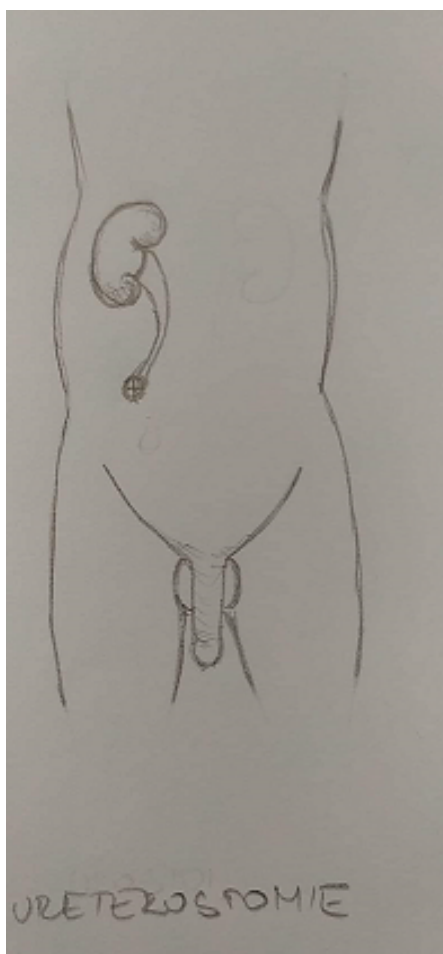
(Zdroj: MUDr. M. Ryšánková Urologická klinika FNHK)



Paliativní derivace moče jsou učeny pro pacienty s krátkou životní prognózou pro špatný celkový stav či pokročilost onkologického onemocnění. Jedná se o prosté vyšítky jednoho či obou močovodů (kožní ureterostomie) či založení nefrostomie do jedné či obou ledvin (Obr. 16).

Obr. 16: Paliativní derivace moči (ureterostomie a nefrostomie) - ilustrační obrázek

(Zdroj: MUDr. M. Ryšánková Urologická klinika FNHK)



Pokud celkový stav pacienta nedovolí provedení radikální cystektomie či pacient tuto léčbu odmítne, alternativou léčby je endoskopická resekce tumoru s konkomitací radiochemoterapií. O výsledcích této léčby chybí data z dlouhodobého sledování. Obecně se však očekává výrazně horší onkologická prognóza v porovnání s radikální cystektomií. O parciální cystektomii se dá uvažovat jen v případě vhodných pacientů se solitárním tumorem ve vrcholu močového měchýře, bez přítomnosti CIS.

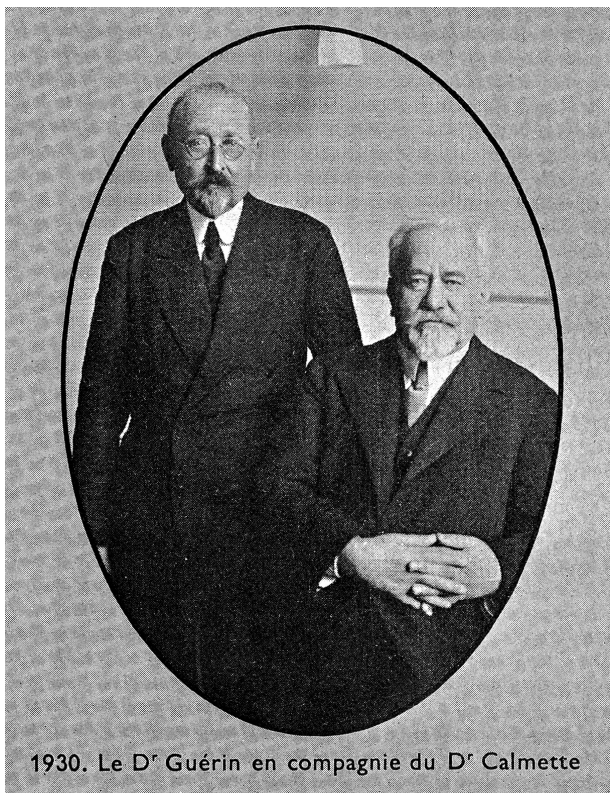
1.7. BCG vakcína

1.7.1. Historie BCG vakcíny

BCG (Bacillus Calmette-Guerin) vakcína byla vyvinuta v roce 1921 bakteriologem Albertem Calmettem a veterinářem Camillem Guerinem, kteří společně pracovali v Pasteurově Institutu v Lille (Obr. 17).

Obr. 17: Camille Guerin (vlevo) a Albert Calmette

(Zdroj: google.com)



Očkování proti tuberkulóze (kalmetizace) vedlo k dramatickému poklesu výskytu tuberkulózy celosvětově a dodnes se řadí k největším objevům 20. století. Objevu předcházelo 13 let pěstování živého, oslabeného kmene *Mycobacterium bovis*, na živné půdě tvořené bramborami se žlučí a glycerinem. Postupně bylo provedeno 231 pasáží, než došlo k takovému oslabení virulence, že bylo možno využít preparát v lidské medicíně. K významnému rozšíření očkování proti tuberkulóze došlo až po druhé světové válce. Plošné očkování novorozenců v ČR bylo zahájeno v roce 1953. V roce 2010 bylo v ČR plošné očkování proti tuberkulóze po 57 letech ukončeno. Nyní se týká pouze rizikových novorozenců⁴².

Původní kultura *M. bovis* byla uchováována v Paříži. Postupně byla subkultivována a distribuována do několika laboratoří po celém světě, kdy vznikly odlišnými kultivačními technikami nové BCG subtypy⁴³. Kmeny využívané pro intravezikální aplikace jsou uvedeny v tabulce, včetně místa kultivace a komerčního názvu (Tab. 6). Metaanalýza studií ohledně efektivity jednotlivých kmenů BCG vakcín neprokázala významnějších rozdílů mezi jednotlivými kmeny užívanými v běžné klinické praxi⁴⁴.

Americký biostatistik Raymond Pearl v roce 1929 jako první popsal nižší výskyt maligních onemocnění u pacientů postižených tuberkulózou. Obdobně pozoroval i fakt, že pacienti, kteří se dokázali zotavit z nádorového onemocnění, častěji v minulosti prodělali tuberkulózu⁴⁵. Výzkum protinádorového efektu BCG vakcíny následně však zpomalila tragická událost v Německu v letech 1929 a 1930, kdy zemřelo 72 dětí po aplikaci kontaminované BCG vakcíny, tzv. Luebecká tragédie, která vedla k dočasnému odporu proti plošnému využívání BCG vakcíny. Další výzkum pak pokračoval až od 50. let 20. století s rozvojem oboru imunologie. Na zvířecích modelech, jako myši či morčata, byla prokázána protinádorová imunologická odpověď na mykobakteriální agens obsažený v BCG vakcíně v pracích Zbara a dalších⁴⁶. Výzkum byl nejprve zaměřen na kožní nádory. Coe a Feldman při výzkumu na morčatech v roce 1966 prokázali silnou pozdní hypersenzitivní reakci močového měchýře po intravezikální aplikaci BCG vakcíny⁴⁷. Srovnatelného efektu dosáhl i Bloomberg při pozdějších pokusech na psech⁴⁸.

Tab. 6: Přehled celosvětově využívaných BCG kmenů pro intravezikální aplikaci

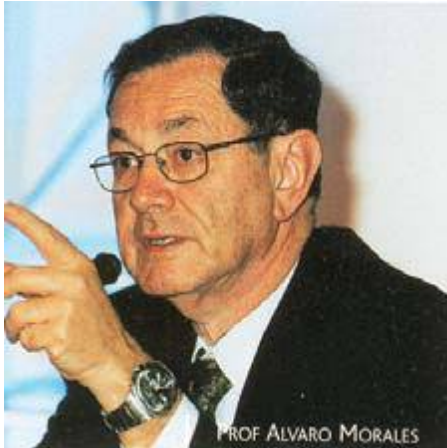
(Zdroj: Hugh Mosafid, Royal Surrey County NHS Foundation Trust)

Kmen	n	Průměrná hladina kompletní odpovědi %	Název komerčního produktu	Hmotnost (mg)	Doporučená dávka (cfu)
Moscow	103	90,5	SII-ONCO-BCG® (Indie)	120	3-57x10 ⁸
Moreau RdJ	100	90	ImmunoBCG (Brazílie)	80	0,04x10 ⁸
Connaught	450	79 (70-92)	Immunocyst® (Francie)	81	1,8-15,9x10 ⁸
Tokyo	111	77 (63-84)	Tokyo 172(Thajsko)	80	0,4-0,5x10 ⁸
Pasteur	230	74 (40-80)	-----	---	---
Tice	277	71 (56-82)	OncoTice®(USA)	12,5	2-8x10 ⁸
Glaxo	180	65(53-88)	-----	---	---
E. Frappier	145	60 (39-100)	-----	---	---
S.African	13	69	-----	---	---
Copenhagen	42	67	-----	---	---
Romanian	33	64	-----	---	---
RIVM/1	15	60	BCG-Medac®	80	2-30x10 ⁸

V roce 1972 kanadský urolog Alvaro Morales navázal na předchozí výzkum a poprvé vyzkoušel intravezikální aplikaci BCG vakcíny na 7 pacientech (Obr. 18).

Obr. 18: Alvaro Morales

(Zdroj: google.com)



Vakcína byla připravena a podána v Armand Frappier Institutu v Montrealu. Bylo podáno 6 dávek v týdenních rozstupech, jednalo se o pacienty s recidivujícím povrchovým karcinomem močového měchýře. U všech sedmi pacientů byla v následné biopsii prokázána pozdní hypersenzitivní reakce s rozvojem granulomatózního zánětu, bez průkazu recidivy malignity. Výsledky byly zveřejněny a publikovány až v roce 1976⁴⁹. Teprve Lamm v roce 1980 v randomizované prospektivní studii potvrdil Moralesovo pozorování a zároveň navrhl optimální protokol intravezikální aplikace BCG vakcíny⁵⁰. Dalším výzkumem Moralese, Herra, Lamma a dalších byl prokázán efekt BCG vakcíny v eradikaci CIS²¹.

V následných 40 letech došlo širokému rozšíření této léčebné metody a stala se standardem léčby high grade neinvazivního karcinomu močového měchýře (Ta, T1) a CIS. Nicméně problematika dávkování, frekvence podávání a délka trvání léčby není dodnes zcela vyjasněna. Intravezikální aplikace BCG vakcíny se stala obecně jednou z nejúspěšnějších imunoterapií v protinádorové léčbě⁵¹⁻⁵¹ (Obr. 19).

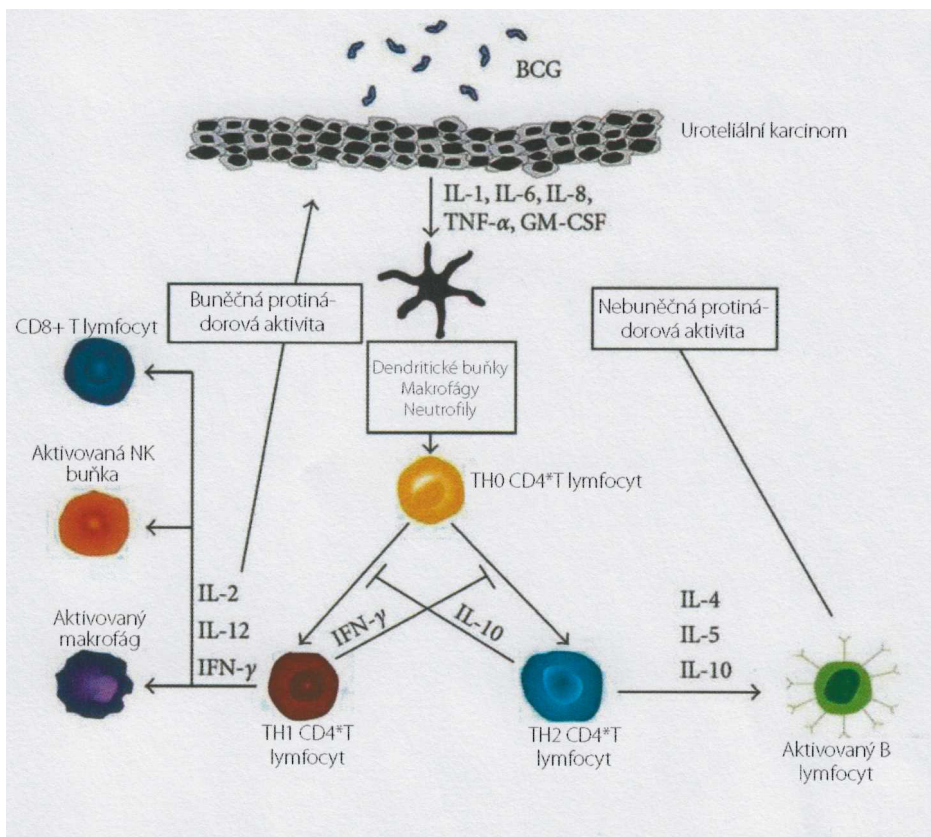
Obr. 19. BCG vakcíny užívané v ČR)
(Zdroj: eu-doctor.com a apteki-israel.info)



1.7.2. Mechanismus účinku BCG vakcíny

Základní mechanismus účinku BCG vakcíny na lidský imunitní systém je znám. Nicméně mnoho otázek stran mechanismu účinku BCG zůstává dále nezodpovězeno. BCG aktivace imunitního systému probíhá v několika krocích. Důležitou roli v průniku BCG do nádorových buněk i nenádorových buněk hraje fibronektin (extracelulární glykoprotein). Následně dojde v buňkách k vyvolání zánětlivé odpovědi⁵³. Lokální imunitní odpověď je aktivována prezentací BCG antigenu buňkami retikuloendoteliálního systému (granulocyty, makrofágy, Th lymfocyty) následované aktivací cytokinu (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF alfa a interferonu gama) do moče⁵⁴. Imunologická kaskáda vede k imunitní protinádorové aktivitě zprostředkované cytotoxickými T lymfocyty, NK (*natural killer*) buňky, neutrofilů a makrofágy (Obr. 20).

Obr. 20: Mechanismus účinku BCG vakcíny⁵⁵



1.7.3. Indikace, účinnost a dávkování BCG vakcíny

BCG intravezikální instalační terapie se stala standardní léčbou u pacientů high grade neinazivním karcinomem močového měchýře (Ta, T1) a CIS. Metaanalýzy studií potvrdily lepší klinické výsledky kombinované terapie, transuretrální resekce tumoru (TUR) a BCG instalace, než TUR samostatně či v kombinaci s intravezikální chemoterapií (mitomycin C) u této skupiny pacientů⁵⁶⁻⁵⁹. BCG instalační terapie snižuje pravděpodobnost progresu tumoru do invazivní formy o 27 %⁴⁴. U pacientů s karcinomem in situ bez léčby dochází k progresi do invazivního karcinomu až u 54 % pacientů²⁰. Selhání BCG instalační terapie u této skupiny pacientů je jednoznačnou indikací k radikální cystektomii.

Optimální dávkovací schéma není doposud zcela ujasněno. Obecně je široká shoda na úvodní indukční terapii BCG vakcínou, kdy dochází k aplikaci 6 dávek po jednom týdnu ve shodě s původním doporučením Moralese⁴⁹. Stran frekvence a délky trvání navazující udržovací terapie BCG, již taková shoda není⁶⁰. Z posledních doporučení EAU *Guidelines* má nejlepší dlouhodobé výsledky 3 roky trvající udržovací léčba. Schéma léčby zahrnuje vždy 3 dávky v intervalu jednoho týdne a to v 3., 6., 12., 18., 24., 30. a 36. měsíci^{61,62}.

1.7.4. Neúspěch léčby BCG vakcínou

Neúspěch BCG instilační intravezikální léčby může mít dva základní důvody: BCG intolerance léčby a BCG selhání. BCG intolerance je nutnost přerušit BCG intravezikální léčbu před jejím kompletním dokončením pro závažné vedlejší účinky léčby. BCG selhání je poněkud širší pojem s několika podskupinami. Obecně lze tento pojem zjednodušit na výskyt invazivního karcinomu, (Ta, T1) *high grade* karcinomu a *carcinoma in situ* (CIS) v průběhu či po dokončení léčby BCG vakcínou. V rámci BCG selhání se můžeme setkat s pojmy jako BCG refrakterní nádor, kdy se objeví časná recidiva (Ta, T1) *high grade* karcinomu či CIS po 3 měsících od zahájení léčby. Relabující nádor je *high grade* tumor, který se objeví po kompletním dokončení BCG léčby, navzdory předchozí dobré onkologické odpovědi. BCG neodpovídající (*unresponsive*) nádor je refrakterní či relabující (Ta,T1) *high grade* tumor vyskytující se do 6 měsíců nebo CIS do 12 měsíců od poslední BCG dávky. Horší onkologická prognóza je spojena s BCG refrakterním tumorem ve srovnání s relabujícími tumory⁶³. Výskyt *low grade* tumoru během sledování po BCG instilaci není považováno za BCG selhání.

Zlatým standardem léčby BCG selhání zůstává radikální cystektomie (LE1a). Ostatní alternativní způsoby mají onkologicky výrazně horší výsledky a pacient by měl být o této skutečnosti plně informován⁶⁴⁻⁶⁶. Informací, eventuálně klinických studií stran alternativní léčby je minimálně. Je několik studií, kde bylo dosaženo relativně dobrého efektu při pokračování BCG udržovací terapie či opakování indukční terapie přes BCG selhání⁶⁷⁻⁶⁸. V současné době probíhá klinická studie s užitím sunitinibu u pacientů s BCG refrakterním *high grade* invazivním karcinomem močového měchýře⁶⁹. Více než 50 % úspěšnost léčby byla pozorována u pacientů s výskytem CIS po třech měsících od zahájení léčby, kde byla BCG léčba opakována⁷⁰.

1.7.5. Komplikace BCG léčby

Intravezikální terapie BCG vakcínou je běžně užívanou metodou léčby *high grade* neinvazivního karcinomu močového měchýře (Ta, T1) a *carcinoma in situ* (CIS)^{49,50,51}. Je to metoda, která je však spojena s relativně častým výskytem nežádoucích vedlejších účinků. Naštěstí, většina z nich má lokální charakter a jsou zvládnutelné ambulantní léčbou. Výskyt závažných, systémových komplikací vyžadujících hospitalizaci a cílenou intenzivní péči je méně než 5 %^{71,72}. Vzhledem k této skutečnosti, by indikace BCG léčby měla být vždy velmi individuálně zvažována. Pacient by měl být plně informován o možných komplikacích. Jednoznačnými kontraindikacemi BCG intravezikální léčby jsou: těhotenství, kojení, stavy spojené s imunosupresí (AIDS, hematologické malignity, léčba kortikoidy či cytostatiky), přecitlivělost na jakoukoliv složku BCG vakcíny, aktivní tuberkulóza, aktivní močová infekce. Vzhledem k tomu, že nejzávažnější komplikace jsou spojeny s průnikem vakcíny (mycoplasmat) do oběhu, je další jednoznačnou kontraindikací akutní či subakutní poranění dolních močových cest (2-3 týdny před aplikací). Může se jednat např. o traumatické cévkování, perforaci měchýře či stav po endoresekcii tumoru⁷³.

Je však potřeba zdůraznit, že asymptomatická leukocyturie či mikrohematurie není důvodem okamžitého přerušení podávání BCG léčby, případně zahájení antibiotické terapie. Jedná se o reakci organismu na granulomatózní zánět sliznice, který je BCG vakcínou vyvoláván a který stojí za mechanismem protinádorového účinku léčby^{72,74}. Není zcela jednoduché určit hranici mezi průvodními žádoucími jevy spojenými s očekávanou reakcí organismu a opravdovou komplikací vyžadující naší pozornost⁷⁵⁻⁷⁶.

Mezi vedlejší efekty lokální léčby nejčastěji patří iritační cystitida a hematurie. Tyto obtíže se dají zvládnout analgetiky, nejlépe NSAID (nesteroidní antiflogistika). Při přetrvávání obtíží déle než 48 h, je již ke zvážení zahájení antibiotické terapie. Léčbou první volby by měly být fluorochinolony po dobu trvání 5 dní až 2 týdnů a dočasným přerušáním instalací. Léčba kortikoidy či antituberkulotiky je vyhrazena pro perzistující obtíže, kde předchází léčba selhala (isoniazid 300 mg/den na 1 až 2 týdny)⁷⁷. Jako relativně vzácně se vyskytující lokální komplikace jsou BCG prostatitida či orchioepididymitida. Zde je již antibiotická léčba, nejlépe flourochinolony, nezbytná. Antituberkulotika jsou na místě při selhávání léčby chinolony (isoniazid 300 mg/den či rifampicin 600 mg/den po dobu 3 měsíců)⁷⁸.

Daleko více ohrožující pro pacienta je systémová reakce způsobená proniknutím oslabených mycoplasmat do oběhu. V extrémním případě mohou vést k postižení plic (pneumonitida, BCG-itidě), postižení jater (BCG hepatitidě), postižení kostí a kloubů (BCG osteomyelitidě, artritida), či akutnímu septickému stavu (BCG sepse)⁷⁹⁻⁸⁰. Ta je způsobena masivním vyplavením zánětlivých cytokinů, jako reakce na přítomnost mycobakterií v oběhu (BCG septikémie). Tato reakce je velmi individuální a u výrazně senzitivních jedinců může rychle dospět v septický šok s fatálními následky⁸¹. Naštěstí takto závažné systémové dopady léčby jsou raritní⁸². Relativně častěji se mohou vyskytnout teploty či bolesti kloubů (chřipkové příznaky). Obtíže trvající do 48 h se dají zvládnout antipyretiky či NSAID a jsou známkou svědčící o probíhající žádoucí imunitní reakci⁷⁵⁻⁷⁶. Obtíže trvající déle či teploty přesahující 38,5 °C, již zasluhují více pozornosti. Zde je nezbytné instilace přerušit, provést kultivační vyšetření moče, krevní testy, rentgenový snímek plic. Na místě je okamžité zahájení antibiotické léčby, nejlépe fluorochinolonom za současné kortikoidní terapie k utlumení imunologické reakce organismu. Antituberkulózní léčba je indikována u přetrvávajících obtíží po konzultaci specialisty⁸³.

Léčba závažných BCG systémových komplikací vyžaduje mezioborovou spolupráci (urolog, pneumolog, intenzivista). V první fázi, zejména pokud je spojena s BCG sepsí, je nutná intenzivní protišoková terapie vyžadující JIP péči spojenou s bolusem tekutin, podporou oběhu. Nezbytné jsou vysoké dávky kortikoidů a antibiotická léčba fluorochinolony. Léčba všech systémových komplikací, po zvládnutí akutní fáze, spočívá v dlouhodobé kombinované léčbě antituberkulotiky. Kortikoidy jsou indikovány jen po dobu klinických příznaků jako prevence hypersenzitivní reakce organismu. Léčba antituberkulotiky musí být dlouhodobá, kombinovaná a pokračující i po odeznění klinický i laboratorních známek zánětu v délce trvání 6 měsíců (isonizid 300/den, rifampicin 600 mg/den, ethambutol 1200 mg/den)⁸⁴. Pacienti musí být pravidelně kontrolováni po celou dobu léčby. Je nutné zdůraznit, že jen zcela výjimečně se podaří prokázat mycobakteriální agens. Veškerá kultivační vyšetření (moč, hemokultury, BAL - bronchoalveolární laváž) bývají zpravidla s negativním výsledkem. Podobně velmi nízkou senzitivitu mají serologická vyšetření i metoda PCR - polymerázová řetězová reakce⁸⁵. Indikací k nasazení antituberkulózní léčby je tedy klinický stav pacienta v souvislosti s podáním BCG vakcíny a současně neustupující příznaky přes intenzivní antibiotickou terapii.

Konzultace specialisty, jako pneumologa či mikrobiologa, je v těchto případech nezbytností. Vzhledem k relativně vzácným výskytům těchto komplikací chybí jednoznačná doporučení České či Evropské pneumologické společnosti stran diagnostiky a léčby⁸⁶.

Alergické reakce na jakoukoliv složku BCG vakcíny jsou též velmi vzácné. Jsou vždy kontraindikací léčby. Mírné projevy jsou zvládnutelné antihistaminiky či kortikoidy. Závažné projevy pak intenzivní protišokovou terapií. Fluorochinolony či dokonce antituberkulotika jsou indikovány jen při perzistenci symptomů.

1.8. Epigenetika

1.8.1. Epigenetické mechanismy (obecně)

Epigenetika je podobor genetiky zabývající změnami DNA, které nezasahují do její sekvence bazí, a však hrají důležitou roli v karcinogenezi maligních onemocnění. Epigenetické procesy často ovlivňují promotorové části genomové DNA, která reguluje mechanismus exprese (aktivaci/inaktivaci transkripce)⁸⁷. Mezi identifikované epigenetické změny patří metylace DNA, acetylace histonů a mikroRNA. Tyto epigenetické regulace dále rozšiřují informační potenciál genetického kódu. Epigenetické modifikace mohou být reverzibilní, což nabízí možnosti jejího ovlivnění. Výzkum nových látek schopných změnit dopad těchto alterací DNA má velký potenciál v léčbě maligních onemocnění.

V DNA nacházející se v jaderném chromatinu dochází pod vlivem strukturálních a dynamických změn k aktivaci či inhibici genové exprese. Tento funkční komplex se nazývá epigenom. Na rozdíl od genomu, který je v každé buňce téže osoby totožný, epigenom má dynamický charakter a může se lišit v jednotlivých buňkách stejného organismu⁸⁷. V dnešní době je již identifikována celá řada epigenetických biomarkerů s možným využitím v diagnostice a sledování prognózy maligních onemocnění s vysokou senzitivitou i specificitou. Nejvíce v tomto směru jsou prozkoumané a popsány změny DNA metylace (např. hypermethylace promotoru p16 u kolorektálního karcinomu atd.).

1.8.2. DNA metylace

V procesu karcinogeneze je nejstudovanějším mechanismem DNA metylace probíhající v promotorových oblastech genů. Mechanismus spočívá v navázání metylu na C-5 uhlík cytosinu v oblasti CpG (pár cytosin-guanin) ostrůvků, prostřednictvím DNA-metyltransferázy. Výsledkem této vazby může být znemožnění nasedání transkripčních faktorů, případně změna konfigurace chromatinu, která neumožňuje transkripci. Dochází k inhibici (umlčení) exprese příslušného genu. Byla vyvinuta celá řada inhibitorů metylace (5-azacytidin, decitabin, prokainamid a další)⁸⁷.

1.8.3. Acetylace histonů (post-translační modifikace histonových proteinů)

Histony jsou proteiny sdružené s chromatinem. Epigenetická modifikace těchto proteinů jako post-translační acetylace (ale i metylace, fosforylace) mají dopad na funkci chromatinu a stav genové exprese. Proces acetylace je katalyzován histon-acetyltransferázou. Acetylovaný chromatin se pak dostane do stavu aktivní transkripce⁸⁷. Inhibice tohoto enzymu má antitumorózní potenciál. Mezi přírodní inhibitory patří např. kyselina anakardová obsažena v kešu oříšcích a celá řada syntetických preparátů.

1.8.4. MikroRNA (umlčování transkripce genů)

Mikro RNAs jsou důležité regulátory buněčné proliferace, diferenciaci a buněčného cyklu. Jedná se o krátké úseky RNA, které nekódují proteiny, ale fungují jako negativní regulátory exprese. Ovlivňují řadu biologických funkcí. Alterované onkogenní miRNAs jsou nacházeny v genomu nádorových buněk⁸⁷. Znalost přítomnosti specifických miRNAs je v klinické praxi využíváno v diagnostice a jako prognostický faktor u různých typů malignit.

2. Cíle

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

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

3. Výzkumná část

3.1. Úvod

Léčba *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře spočívá v kompletní endoresekcí tumoru v kombinaci s následnou Bacillus Calmette-Guérin (BCG) intravezikální instalační imunoterapií. Alternativou této léčby je radikální cystektomie, jak již bylo zmíněno v obecné části. Rozhodování mezi touto konzervativní a radikální metodou je v běžné klinické praxi často velmi složité. Na jedné straně je obava ze selhání konzervativní terapie a ztráty času před radikálním řešením, která může mít zásadní dopad na onkologickou prognózu pacienta. Na straně druhé, je obava z *overtreatmentu*, zbytečné mutilace pacienta a snížení kvality života, která je spojena s radikální cystektomií. Určitou formou pomoci je např. určování skóre rekurence či progresu onemocnění dle doporučení Evropské Urologické Společnosti⁸⁸. Nicméně jednoznačný klinický či biochemický marker, který by dokázal odlišit pacienty vhodné a nevhodné k BCG terapii, neexistuje.

Etiologie malignit, včetně karcinomu močového měchýře, bývá multifaktoriální. Na její patogenezi se podílí vliv zevního prostředí, genetické, epigenetické a imunologické procesy. Epigenetika je podobor genetiky zabývající změnami DNA, které nezasahují do její sekvence, a však hrají důležitou roli v karcinogenezi. Mezi epigenetické změny patří např. metylace DNA, mikro RNA či acetylace histonů.

Methylace DNA představuje kovalentní chemická vazba metylové skupiny na C-5 (uhlík v pozici 5) cytosinového kruhu. Nejčastěji se metylace cytosinu vyskytuje v místě sekvence 5'-CG-3' je zprostředkována DNA cytosin-metyltransferázou. Změny metylací v daných oblastech DNA mohou vést následně ke změně exprese tohoto genu. V procesu karcinogeneze patří mezi nejvýznamnější změny metylace CpG ostrůvků v promotorových oblastech tumor supresorových genů. Tyto změny mohou vést k nastartování procesu karcinogeneze v normální buňce⁸⁹⁻⁹⁰.

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

3.2.1. Cíl

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

3.3.2 Soubor a metoda

Retrospektivně jsme zhodnotili data 82 pacientů s povrchových *high grade* karcinomem močového měchýře (Ta, T1, CIS), kteří prodělali instalační BCG terapii po kompletní endoresekcii tumoru na Urologické klinice FN Hradec Králové. Základní soubor byl rozdělen do dvou podskupin a to na skupinu s dobrou odpovědí a skupinu se selháním léčby. Do skupiny pacientů s BCG selháním byli zařazeni pacienti, kde došlo buď k rekurenci či progresi onemocnění nebo dokonce zemřeli na chorobu během sledování. Do skupiny pacientů s dobrou odpovědí byli zařazeni ti, kde během sledování nedošlo k rekurenci *high grade* karcinomu či jeho progresi v invazivní nebo metastatický tumor. Doba sledování pacientů byla 2 až 13 roků.

K zařazení do studie musely být splněny následující podmínky: kompletní, hluboká resekce tumoru s přítomností svaloviny detrusoru ve vzorku, žádná předchozí instilací terapie, kompletní 6 -týdenní indukční terapie BCG vakcínou následovanou udržovací BCG terapií. Schéma podávání udržovací BGG terapie není jednoznačně definováno žádnými doporučeními. Na Urologické klinice FNHK je dodržován protokol udržovací BCG terapie, spočívající v aplikaci BCG vakcíny v tříměsíčních cyklech. V každém cyklu jsou podány 3 dávky v týdenních intervalech. Doba trvání udržovací terapie byla minimálně 12 měsíců, pokud nedošlo k selhání terapie dříve. Pacienti absolvují každé 3 měsíce kontrolní cystoskopii. Tyto definované podmínky splnilo 66 pacientů a ti byli zařazeni do studie.

U sledovaného souboru jsme hodnotili demografická data: věk, pohlaví, životní styl (kouření). Dále jsme hodnotili charakteristiky nádoru: velikost tumoru (< 3 cm/ ≥ 3 cm), přítomnost či nepřítomnost CIS ve vzorku. U všech tumorů se vypočítalo EORT skóre rekurence a progresu. Dále byla zhodnocena celková léčebná odpověď na podanou BCG vakcínu. Pokud došlo k selhání léčby byla hodnocena doba do selhání a jeho závažnost (rekurence, progresu, smrt). Pro porovnání věku a skóre mezi skupinami byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Pro parametrická data byl užit χ^2 test.

3.2.3. Výsledky

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

Obě skupiny pacientů s tumory (BCG odpověď i selhání) byly homogenní bez statisticky významných odchylek. Mezi oběma skupinami BCG nebyl signifikantní rozdíl v pohlaví, velikosti tumoru, přítomnosti CIS a kuřáctví. BCG selháním bylo spojeno s vyšším skóre rekurence ($p=0,0109$). Skóre progresu nebylo spojeno se statistickou signifikací s BCG selháním v naší skupině pacientů ($p=0,188$). Data jsou prezentována tabulkou (Tab. 7).

Tab. 7: Demografická charakteristika obou podskupin pacientů

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

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

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

3.2.4. Závěr

V našem souboru pacientů byl potvrzen dobrý klinický efekt BCG instilační terapie u pacientů *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře. Meta-analýzy klinických studií potvrdily příznivý efekt léčby BCG ve srovnání jen se samotnou endoresekcí tumoru či endoresekcí spojenou s instilační chemoterapií⁵⁷⁻⁵⁹. BCG terapie snižuje u této skupiny pacientů riziko progresu až o 27 %⁴⁴. Bez léčby až 54 % pacientů s CIS progreduje v invazivní karcinom močového měchýře²¹. U našich pacientů nebyla spojena přítomnost CIS ani vyšší skóre progresu s vyšším rizikem selhání léčby, což neodpovídá očekávaným předpokladům. Vysvětlením může být pravděpodobně nedostatečná velikost souboru.

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

3.3.1. Cíl

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

3.3.2. Soubor a metoda

V archivu patologického ústavu byly vyhledány vzorky tumorů všech 66 pacientů s *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře, kteří splnili definované podmínky pro zařazení do studie. Reprezentativní vzorek tumoru byl následně předán biochemikům k epigenetickému zpracování. Kontrolní tkáň, normální (nemaligní) sliznice močového měchýře, byla získána od 13 pacientů, kteří podělali cystektomií pro nemaligní (např. píštěl) či maligní (tumor části měchýře) indikaci. Výzkumní záměr byl schválen Etickou komisí našeho pracoviště.

Z dodané tkáně tumoru a kontrolní tkáně byla unikátní metodou izolovaná DNA, která byla následně využita pro samotnou epigenetickou analýzu. Z palety možných epigenetických změn byla na základě literárního průzkumu a dostupnosti laboratorních metod zvolena analýza změn metylací DNA v nádorové tkáni. Pro samotnou metylační analýzu byla zvolena metoda Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MS-MLPA).

K dosažení cíle bylo nutno porovnat výsledky metylační analýzy mezi tumorózní tkání a kontrolní nepostiženou tkání. Pro porovnání výskytu genů mezi skupinami byl použit Fisherův přesný test rozdílu dvou relativních hodnot. Jako signifikantní byla určena *p-value* <0.05. Byla užita Bonferroniho modifikace signifikace.

3.3.2.1. Izolace DNA

Parafinové vzorky tumoru močového měchýře byly získány z archivu patologické kliniky. Všechny vzorky byly připraveny a zkontrolovány zkušeným patologem.

Podmínkou zařazení do kontrolní skupiny byla makroskopicky i mikroskopicky normální sliznice močového měchýře. Touto selekcí prošla pouze 1/3 získaných vzorků. Vzorky byly získány na základě informovaného souhlasu získaného od pacienta před plánovaným výkonem.

DNA byla izolována z tkáňových vzorků fixovaných ve formalínu, zalitých v parafínu pomocí Qiagen DNA extrakčního kitu (Hilden, Germany) dle protokolu výrobce s minimem úprav (Obr. 21). Izolace DNA z tkáňových vzorků fixovaných ve formalínu, zalitých v parafínu se skládá z 6-ti základních kroků.

Obr. 21: Qiagen DNA extrakční kit

(Zdroj:Mgr. Marcela Chmelařová, Ph.D.)



Prvním krokem je odstranění parafínu jeho rozpuštěním v xylenu. Dalším krokem je lýza vzorku působením proteinázy K (56 °C, přes noc). Třetím krokem je inkubace při 70 °C (10 minut), při níž dochází ke zvrácení formalínem vyvolaného zesíťování. Následuje navázání DNA na membránu a odstranění kontaminujících nečistot. Posledním šestým krokem je eluování koncentrované DNA z membrány. Měření koncentrace izolované DNA bylo provedeno dle protokolu výrobce pomocí dvou technik: fluorimetricky (Qubit, Invitrogen) a spektrofotometricky (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific).

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

V naší práci byly použity dva MS-MLPA kity: ME001 a ME004 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), které mohou analyzovat atypickou metylaci u několika tumor supresorových genů (Tab. 8). Sekvence prob, genová místa a pozice na chromozómu mohou být nalezeny na <http://www.mlpa.com>. Metylace jednotlivých genů byla stanovena pomocí dvou prob, které obsahovaly různá HhaI restriční místa. Experimentální postup byl proveden podle protokolu výrobce, s minimem modifikací.

Tab. 8: Vybrané geny pro metylační analýzu: MS-MLPA (KIT ME001 a KIT ME004)

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

VHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor	03810-L01211	3p25.3
ESR1	Estrogen receptor 1	02202-L01700	6q25.1
RASSF1 (b)	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	03807-L02159	3p21.31
TP73	Tumor protein p73	04050-L01263	1p36.32
FHIT	Fragile histidine triad	02201-L01699	3p14.2
IGSF4	Cell adhesion molecule 1	03819-L03848	11q23.3
CDH13	Cadherin 13, H-cadherin	07946-L07727	16q23.3
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	01638-L01176	11q13.2
MLH1 (b)	MutL homolog 1	02260-L01747	3p22.2
EPHB2	Ephrin receptor B2	07910-L07623	1p36.1
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	10344-L10882	18q21.3
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	10345-L11988	10q23.3
NF1 (a)	Neurofibromin 1	03845-L03318	17q11.2
RARRES1	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	03308-L13245	3q25
TERT	Telomerase reverse transcriptase	10346-L10884	5p15.3
THBS1	Thrombospondin 1	02739-L02166	15q15
SFRP1 (a)	Secreted frizzled-related protein 1	10564-L13246	8p11.2
IGF2R (a)	Insulin-like growth factor 2 receptor	02800-L02185	6q26
NF1 (b)	Neurofibromin 1	03844-L03317	17q11.2
TWIST1	Twist homolog 1	07015-L06626	7p21.2
APAF1 (a)	Apoptotic peptidase activating factor 1	09165-L09458	12q23.1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	03955-L03394	20p12.3
DNAJC15	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15	03297-L02661	13q14.1
NTRK1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	03970-L03357	1q23.1
PXMP4 (a)	Peroxisomal membrane protein 4	03303-L13247	20q11.2
MEN1 (a)	Multiple endocrine neoplasia I	09168-L09461	11q13.1
LMNA	Lamin A/C	12287-L13799	1q22
APAF1 (b)	Apoptotic peptidase activating factor 1	09166-L09459	12q23.1
PCCA	Propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide	08676-L08688	13q32.3
PAX6	Paired box 6	03748-L03208	11p13
RBM14	RNA binding motif protein 14	09429-L09678	11q13
MUS81 (a)	MUS81 endonuclease homolog	09157-L09315	11q13.1
IGF2R (b)	Insulin-like growth factor 2 receptor	02801-L02186	6q26
SFRP1 (b)	Secreted frizzled-related protein 1	10563-L11109	8p11.2
GATA4	GATA binding protein 4	03754-L13255	8p23.1
PXMP4 (b)	Peroxisomal membrane protein 4	03304-L13248	20q11.2
MEN1 (b)	Multiple endocrine neoplasia I	09167-L09460	11q13.1
MUS81 (b)	MUS81 endonuclease homolog	10574-L09314	11q13.1
WIF1	WNT inhibitory factor 1	10361-L10899	12q14.3
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	10364-L13254	16q22.1

V krátkosti, DNA (100 ng) byla rozpuštěna v 5 μ l TE-pufu (10 mM Tris·Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0), denaturována a následně ochlazena na 25 °C. Po přidání směsi prob, byly proby přes noc hybridizovány (16-18 hodin) při 60 °C. Následně byly vzorky rozděleny na dva podíly: jedna polovina vzorku byla přímo ligována, zatímco druhá polovina vzorku byla společně s ligázou vystavena působení restriční endonukleázy HhaI (30 minut při 49 °C). Toto štěpení způsobilo ligaci pouze nenaštěpené (metylované) DNA sekvence. Amplifikační PCR reakce byla provedena ve standardním termocykléru (GeneAmp 9700, Applied Biosystems) a využívala teplotní profil: 35 cyklů denaturace při 95 °C 30 s, *annealing* při 60 °C 30 s a extenze při 72 °C 1 minutu, zakončeno závěrečnou extenzí 20 minut při 72 °C (Obr. 22).

Obr. 22: Termocyklér GeneAmp 9700

(Zdroj: Mgr. Marcela Chmelařová, Ph.D.)



Alikvoty PCR reakce (0,6 μ l) byly smíchány s 0,2 μ l vnitřního standardu GeneScan™ –500 LIZ® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 9,0 μ l formamidu. Po denaturaci byly fragmenty separovány a kvantifikovány na ABI3130 kapilárním sekvenátoru a analyzovány pomocí GeneMapper 4,0 (oba Applied Biosystems) (Obr. 23).

Obr. 23:Kapilární sekvenátor ABI3130

(Zdroj:Mgr. Marcela Chmelařová, Ph.D.)



Plochy píků s odpovídající velikostí párů bází (bp) byly použity pro další zpracování dat. Poměr metylace byl získán následujícím výpočtem: $Dm = (Px / Pctrl) Dig / (Px / Pctrl) Undig$, kde Dm je poměr metylace, Px je plocha píku dané sondy, Pctrl je součet ploch píků všech kontrolních sond, Dig znamená HhaI štěpený vzorek a Undig neštěpený vzorek. Dm se může pohybovat od 0 do 1,0 (odpovídá 0 % -100 % metylované DNA). Na základě předchozích experimentů jsme považovali promotor za metylovaný, pokud $Dm \geq 0,2$, což odpovídá 20 % metylované DNA⁹¹⁻⁹².

CpG univerzálně metylovaná a nemetylovaná DNA (Zymoresearch, Irvine, CA, USA) byly použity v každém běhu jako kontroly.

3.3.3. Výsledky

Kompletní nebo částečná metylační analýza byla provedena u 57 pacientů s tumorem měchýře a 13 kontrolních pacientů. Izolace DNA byla neúspěšná u 9 pacientů, kde tedy metylační analýzu nebylo možno provést.

U povrchového *high grade* karcinomu močového měchýře byly zjištěny změny metylací v porovnání s kontrolní tkání u těchto genů: WIF1, GATA4, TERT, BLC2, CDH13, RASSF1a, RASSF1b, TP73, CDKN2B, APC, TWIST1, PTEN, SFRP1b. Zcela nově byly námi identifikovány změny metylací genů MUS81a, NTRK1 a PCCA.

3.3.4. Závěr

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

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

3.4.1. Cíl

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

3.4.2. Soubor a metoda

Byla provedena statistická analýza dat 57 pacientů s *high grade* NMIBC a CIS močového měchýře, u kterých byla úspěšně dokončena metylační analýza (viz kapitola 3.3.). Tento základní soubor byl rozdělen na základě znalostí dalšího vývoje onemocnění po podání BCG vakcíny. Soubor byl rozdělán na skupinu s dobrou odpovědí na BCG léčbu (n=41) a s BCG selháním (n=16). Statistickými metodami byly hodnoceny rozdíly metylačních změn DNA mezi oběma skupinami.

Pro porovnání výskytu genů mezi skupinami byl použit Fisherův přesný test rozdílu dvou relativních hodnot. Jako signifikantní byla určena *p-value* <0,05. Byla užita Bonferroniho modifikace signifikace.

3.4.3. Výsledky

Ze všech 56 analyzovaných genů byly odhaleny signifikantní změny metylací u dvou genů. Nepřítomnost metylací genů CDKN2B ($p=0,00312^{**}$) a MUS81a ($p=0,0191^{*}$) byla spojena se selháním BCG léčby (Tab. 9).

Tab. 9: Přítomnost metylací vybraných genů u jednotlivých podskupin pacientů

gen	BCG selhání (n=16)	BCG odpověď (n=41)	Nádorová skupina	Kontrolní skupina (n=13)	<i>p</i> ¹	<i>p</i> ²
TIMP3	3 (19 %)	6 (15 %)	9 (16 %)	0 (0 %)	0,189	0,710
APC	7 (44 %)	14 (34 %)	21 (37 %)	0 (0 %)	0,00635*	0,761
CDKN2A	1 (6 %)	1 (2 %)	2 (4 %)	0 (0 %)	1,00	0,501
MLH1a	3 (19 %)	6 (15 %)	9 (16 %)	0 (0 %)	0,189	0,710
ATM	1 (6 %)	1 (2 %)	2 (4 %)	0 (0 %)	1,00	0,501
RARB	1 (6 %)	5 (12 %)	6 (11 %)	0 (0 %)	0,587	0,659
CDKN2B	2 (13 %)	22 (54 %)	24 (42 %)	1 (9 %)	0,0229*	0,00312**
HIC1	1 (7 %)	2 (4 %)	3 (5 %)	0 (0 %)	1,00	1,00
CHFR	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
BRCA1	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
CASP8	1 (6 %)	0 (0 %)	1 (2 %)	0 (0 %)	1,00	0,291
CDKN1B	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
KLLN	1 (6 %)	2 (4 %)	3 (5 %)	0 (0 %)	1,00	1,00
BRCA2	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
CD44	3 (19 %)	3 (7 %)	6 (11 %)	0 (0 %)	0,587	0,342
RASSF1a	8 (50 %)	15 (37 %)	23 (40 %)	0 (0 %)	0,00289**	0,550
DAPK1	1 (6 %)	2 (4 %)	3 (5 %)	0 (0 %)	1,00	1,00
VHL	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
ESR1	2 (13 %)	6 (15 %)	8 (14 %)	0 (0 %)	0,338	1,00

RASSF1b	8 (53 %)	18 (44 %)	26 (46 %)	0 (0 %)	0,00104**	1,00
TP73	6 (33 %)	18 (44 %)	24 (42 %)	2 (15 %)	0,0229*	0,765
FHIT	0 (0 %)	1 (2 %)	1 (2 %)	0 (0 %)	1,00	1,00
CADM1	2 (13 %)	4 (10 %)	6 (11 %)	0 (0 %)	0,587	1,00
CDH13	13 (81 %)	35 (85 %)	48 (84 %)	3 (27 %)	0,00001***	0,402
GSTP1	1 (6 %)	2 (4 %)	3 (5 %)	0 (0 %)	1,00	1,00
MLH1b	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
EPHB2	1 (6 %)	0 (0 %)	1 (2 %)	0 (0 %)	1,00	0,275
BCL2	11 (69 %)	27 (66 %)	38 (67 %)	1 (8 %)	0,00002***	1,00
PTEN	4 (27 %)	19 (46 %)	23 (40 %)	0 (0 %)	0,00236**	0,210
NF1a	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
RARRES1	0 (0 %)	7 (17 %)	7 (12 %)	0 (0 %)	0,328	0,169
TERT	14 (88 %)	37 (90 %)	51 (89 %)	5 (38 %)	< 0,00001***	1,00
THBS1	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
SFRP1a	12 (80 %)	36 (88 %)	48 (84 %)	10 (91 %)	0,0925	0,179
IGF2R	1 (7 %)	3 (6 %)	4 (7 %)	0 (0 %)	0,574	1,00
NF1b	1 (7 %)	6 (15 %)	7 (12 %)	0 (0 %)	0,328	0,657
TWIST1	14 (88 %)	37 (90 %)	51 (81 %)	9 (69 %)	0,00113**	1,00
APAF1a	14 (88 %)	35 (85 %)	49 (86 %)	11 (85 %)	0,181	1,00
PCNA	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-

DNAJC15	3 (20 %)	15 (37 %)	18 (32 %)	8 (73 %)	0,117	0,326
NTRK1	8 (50 %)	19 (46 %)	27 (47 %)	1 (9 %)	0,00396**	0,762
PXMP4a	2 (13 %)	2 (4 %)	4 (7 %)	0 (0 %)	0,574	0,300
MEN1a	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
LMNA	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
APAF1b	1 (7 %)	3 (6 %)	4 (7 %)	0 (0 %)	0,574	1,00
PCCA	4 (26 %)	14 (34 %)	18 (32 %)	0 (0 %)	0,0130*	0,744
PAX6	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
RBM14	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
MUS81a	5 (33 %)	28 (68 %)	33 (58 %)	0 (0 %)	0,00002***	0,0191*
IGF2R	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
SFRP1b	6 (40 %)	17 (41 %)	23 (40 %)	0 (0 %)	0,00236**	1,00
GATA4	12 (75 %)	31 (76 %)	43 (75 %)	4 (31 %)	0,00036***	1,00
PXMP4b	2 (13 %)	1 (4 %)	3 (5 %)	0 (0 %)	1,00	0,179
MEN1b	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	-	-
MUS81b	1 (7 %)	3 (6 %)	4 (7 %)	0 (0 %)	0,574	1,00
WIF 1	7 (47 %)	18 (44 %)	15 (44 %)	1 (9 %)	0,00962*	1,00

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

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

Signifikance s Bonferroni modifikací: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

3.4.4. Závěr

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

3.5. Diskuze

Karcinom močového měchýře je typickou malignitou vyššího věku. Častěji se vyskytuje u mužů, což je dáno větším zastoupením kuřáků mezi muži a častějšímu vystavení mužů rizikovým faktorům v zaměstnání (viz kapitola Etiologie). V porovnání s ostatními regiony patří Česká republika k zemím s nejvyšším výskytem karcinomu močového měchýře nejen v rámci EU, ale i celosvětově. S naší celkovou incidencí 13,2/100000 obyvatel jsme na 5. místě v EU a 8. místě v celosvětovém porovnání⁵. V době diagnózy je průměrně 75 % nádorů ve stadiu do svalů neinvadujícího nádoru stádia Ta, T1 či *carcinoma in situ* (CIS)⁶.

Diagnostika karcinomu močového měchýře je založena na klinických symptomech, zobrazovacích a endoskopických event. cytologických vyšetřeních (viz kapitola Diagnostika). Nádorové markery jsou jistě budoucností diagnosticky a sledování pacientů s karcinomem močového měchýře. Ze známých nádorových markerů zatím bohužel žádný nedosáhl takové senzitivity či specificity, aby mohl být využit v běžné klinické praxi. Léčba NMIBC je založena na snaze o kompletní endoskopické odstranění tumoru a to samostatně či ve spojení s intravezikální instalační léčbou (viz kapitola Léčba).

Intravezikální chemoterapie spočívá v aplikaci mitomycinu-C (epirubicin, doxorubicin méně častěji) do močové měchýře. Jako nejefektivnější se jeví okamžitá jednorázová aplikace do 24 h (nejlépe do 2 h) po provedené endoresekcii s cílem zničit cirkulující nádorové buňky a reziduální nádorové buňky v močovém měchýři po endoresekcii³⁸. Užívání následné intravezikální chemoterapie je spojena s problematikou nejasného dávkování a doby trvání léčby. Smysluplná se zdá jen u nízké rizikových pacientů, kde snižuje pravděpodobnost recidivy³⁹.

Intravezikální BCG instalační terapie je zejména určena pro vysoce rizikové pacienta s *high grade* tumorem a CIS. Potřeba je však zdůraznit, že její využití v léčbě *high grade* NMIBC a CIS je jednou z nejméně úspěšných využití imunoterapie v léčbě nádorového onemocnění.⁵¹⁻⁵². BCG instalační terapie je spojena s celou řadou otázek a problémů. Jedním z problémů jsou časté výpadky BCG vakcíny na trhu s léčivou v posledních letech. Následkem toho je snížená dostupnost BCG vakcíny pro klinické využití a to nezdědka vede k nedodržení schématu podávání. Další dlouhodobě problematickou záležitostí je správná aplikace a dávkování BCG vakcíny. Obecná shoda je pouze na indukční terapii BCG, která spočívá

v aplikaci 6 dávek v jedno týdenních intervalech. Zejména pak v udržovací BCG terapii jsou významné rozdíly mezi jednotlivými pracovišti, pokud je vůbec podávána. Z posledních doporučení EAU *Guidelines* má nejlepší dlouhodobé výsledky 3 roky trvající udržovací léčba. Schéma léčby zahrnuje vždy 3 dávky v intervalu jednoho týdne a to v 3., 6., 12., 18., 24., 30., a 36. měsíci^{61,62}.

Dobrá účinnost BCG vakcíny je vykoupena celou řadou nežádoucích efektů. Nicméně závažnější vedlejší účinky jsou popsány u méně než 5% pacientů⁹⁴. Nejčastější jsou lokální komplikace způsobené iritací sliznice močového měchýře BCG vakcínou, jako je cystitida či hematurie. Tyto obtíže jsou většinou snadno zvládnutelné a nebývají důvodem přerušení léčby. Jak již bylo řečeno závažné komplikace s BCG instilační terapií jsou vzácné a téměř vždy jsou spokojeny s nedodržením zásad správného podávání či kontraindikací. Systémová reakce organismu je spojena s průnikem mycoplasmat do krevního řečiště (BCG septikémie), což vede k bouřlivé imunitní odpovědi. Mezi takto závažné stavy patří BCG sepse, BCG pneumonitida, vzácně byly popsány i BCG hepatitida, BCG osteomyelitida či artritida. Léčba těchto komplikací vyžaduje zejména v první fázi JIP s intenzivní protišokovou terapií. Po zvládnutí akutního stavu pak následuje mnohaměsíční antituberkulotiky. Tyto závažné stavy si vyžadují úzkou spolupráci mezi urologem intenzivistou a pneumologem. Je však důležité říci, že BCG instilační terapie je při dodržení zásad správné aplikace bezpečnou léčebnou metodou, kde terapeuticky benefit výrazně převyšuje rizika možných komplikací. Podrobnosti o komplikacích BCG léčby a možnosti jejich zvládnutí jsou pak podrobně popsány v kapitole BCG komplikace.

Přes uspokojivé klinické výsledky léčby BCG vakcínou, je celá řada pacientů, kde dochází k selhání této léčby. Na tuto problematickou skupinu pacientů byl zaměřen náš výzkum. V dnešní době neexistuje biochemický marker, který by dokázal předurčit selhání BCG léčby. Určitou formou pomoci je určování skóre rekurence či progresu onemocnění dle doporučení Evropské Urologické Společnosti (Tab. 6)⁸⁸. U pacientů, kde selže konzervativní přístup s BCG terapií, je pouze oddáleno radikální řešení, tedy radikální cystektomie s nutností derivace moče (viz kapitola Léčba). Tato časová prodleva v řádu měsíců může mít zásadní dopad na onkologickou prognózu pacienta⁹⁵. Zlatým standardem léčby BCG selhání zůstává radikální cystektomie. Ostatní alternativní způsoby mají onkologicky výrazně horší výsledky⁶⁴⁻⁶⁶. Informací, eventuálně klinických studií stran alternativní léčby je minimálně. Je několik studií, kde bylo dosaženo relativně dobrého efektu při pokračování BCG udržovací

terapie či opakovaní indukční terapie přes BCG selhání⁶⁷⁻⁶⁸. V současné době probíhá klinická studie s užitím sunitinibu u pacientů s BCG refrakterním *high grade* invazivním karcinomem močového měchýře⁶⁹.

Etiologie malignit, včetně karcinomu močového měchýře, bývá multifaktoriální. Na její patogenezi se podílí vliv zevního prostředí, genetické, epigenetické a imunologické procesy. Epigenetika je podobor genetiky zabývající změnami DNA, které nezasahují do její sekvence, avšak hrají důležitou roli v karcinogenezi. Epigenetické procesy často ovlivňují promotorové části genomové DNA, která reguluje mechanismus exprese (aktivaci/inaktivaci transkripce)⁸⁷. Tyto epigenetické regulace dále rozšiřují informační potenciál genetického kódu. Epigenetické modifikace mohou být reverzibilní, což nabízí možnosti jejího ovlivnění. Výzkum nových látek schopných změnit dopad těchto alterací DNA má velký potenciál v léčbě maligních onemocnění. V dnešní době je již identifikována celá řada epigenetických biomarkerů s možným využitím v diagnostice a sledování prognózy maligních onemocnění s vysokou senzitivitou i specificitou.

Mezi epigenetické změny patří např. metylace DNA, mikro RNA či acetylace histonů (viz. kapitola Epigenetika). Nejvíce v tomto směru jsou prozkoumané a popsány změny DNA metylace. Změny metylací hrají důležitou roli v karcinogenezi u velké části nádorových onemocnění, včetně karcinomu močového měchýře⁹⁶⁻¹⁰⁵. Methylace DNA představuje kovalentní chemická vazba metylové skupiny na C-5 (uhlík v pozici 5) cytosinového kruhu. Nejčastěji se metylace cytosinu vyskytuje v místě sekvence 5'-CG-3' je zprostředkována DNA cytosin-metyltransferázou. Změny metylací v daných oblastech DNA mohou vést následně ke změně exprese tohoto genu. V procesu karcinogeneze patří mezi nejvýznamnější změny metylace CpG ostrůvků v promotorových oblastech tumor supresorových genů. Tyto změny mohou vést k nastartování procesu karcinogeneze v normální buňce⁸⁹⁻⁹⁰. Znalost metylační změny by mohla být využita v odhadu léčebné odpovědi na BCG instilační terapii a určit nevhodné pacienty k BCG léčbě, u kterých je na místě časný radikální léčebný přístup¹⁰⁶⁻¹⁰⁷.

V naší práci byly pro metylační analýzu zkušeným biochemikem vybrány a použity dva MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) kity: ME001 a ME004 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), které mohou analyzovat atypickou metylaci u několika tumor supresorových genů (Tab. 8). Studijní použití kitů bylo provedeno podle protokolu výrobce, s minimem modifikací. Sety MS-MLPA

(ME001 a ME 004) byly vybrány s předpokladem odhalení nových typických metylačných změn pro karcinom močového měchýře a která zatím nebyly užity ve výzkumu dané problematiky.

Nejčastěji bývají popisovány hypermetylace promotorových oblastí vybraných tumor supresorových genů. Takový nález je však nutné dát vždy do kontextu s klinickým nálezem. Může být spojen jak s dobrou tak špatnou prognózou dle typu nádoru a identifikované hypermetylace^{101-103,106,108}. Stejným způsobem hypometylace (nepřítomnost metylace) vybraného tumor supresorového genu může být spojena s klinickou odpovědí¹⁰⁶⁻¹⁰⁷.

CDKN2B gen kódující inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2B. Tento gen se nachází v blízkosti tumor supresorového genu CDKN2A, kde byly nalezeny četné mutace u širokého spektra tumorů. Inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2B tvoří komplex s CDK4 a CDK6 a zabraňuje jejich aktivaci, tím je zablokována tvorba proteinu (ze skupiny buněčný růstových faktorů), které kontrolují G1 fázi buněčného cyklu. Methylace CDKN2B již byla identifikována u některých malignit (dlaždicobuněčný karcinom laryngu, akutní myeloidní leukémie, karcinom ovaria)¹⁰⁹⁻¹¹¹.

MUS81 (Structure-Specific Endonuclease Subunit) je protein kódující gen. MUS81 protein patří do skupiny DNA strukturálně-specifických nukleáz, která mají důležitou roli při replikaci a reparaci DNA¹¹².

Nepřítomnost metylací promotorových oblastí tumor supresorových genů CDKN2B a MUS81 byla spojena se selháním BCG léčby v našem výzkumu. Mechanismus, který vede k tomuto klinickému výstupu není znám. Publikované výstupy stran předurčení odpovědí na BCG instilační terapii u povrchového *high grade* karcinomu močového měchýře jsou velmi chudé. Jako nadějný geny v této problematice se jeví také *polyamide-modulated factor-1* (PMF-1) či kombinace genů MSH6 s THBS1^{106,107}.

BCG intravezikální instilační terapie je účinná metoda léčby *high grade* NMIBC a *carcinoma in situ* (CIS) močového měchýře. Možný léčebný benefit pro pacienta stále převyšuje rizika spojená s léčbou. Nezbytností je plná informovanost pacienta o možných komplikacích. Pokud jsou dodržena pravidla správného podávání a kontraindikace je BCG vakcína bezpečnou metodou léčby. Handikapem v klinické praxi však zůstává obtížná predikovatelnost selhání léčby BCG vakcínou.

4. Seznam použité literatury

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9.
2. Vařechová K, Povová J, Janout V. Epidemiologie karcinomu močového měchýře. *Urol. praxi*, 2013; 14(3): 104–108.
3. Babjuk M, Matoušková M, Finek J, Petruželka L. Konsenzuální doporučené postupy v uroonkologii. Praha: Galén 2009. IBSN 978-80-7262-639-7.
4. Olfert SM, Felknor SA, Delclos GL. An updated review of the literature: risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures. *South Med J*. 2006 Nov;99(11):1256-
5. <http://www.svod.cz>
6. Compérat E, Larré S, Roupret M, Neuzillet Y, Pignot G, Quintens H, Houéde N, Roy C, Durand X, Varinot J, Vordos D, Rouanne M, Bakhri MA, Bertrand P, Jeglinschi SC, Cussenot O, Soulié M, Pfister C. Clinicopathological characteristic of urothelial bladder cancer in patient less than 40 year sold. *Virchows Arch*. 2015 May;466(5):589-94. doi: 10.1007/s00428-015-1739-2. Epub 2015 Feb 20.
7. Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urol Oncol*. 2012 Mar-Apr;30(2):199-211. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.10.010.
8. Silverman DR, Morrison AS, Devesa SS. *Cancer Epidemiology and Prevention*. Second Edition. New York: Oxford University Press 1996. ISBN 0-19-505050-0.
9. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeny LA, La Vecchia C, Shariat S, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013 Feb;63(2):234-41. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033. Epub 2012 Jul 25

10. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011 Aug 17;306(7):737-45. doi: 10.1001/jama.2011.1142.
11. Katolická J, Hrubá D. Faktory ovlivňující vznik karcinomu močového měchýře. *Urolog. pro Praxi*, 2003; 4: 142-144.
12. Murta-Nascimento C, Schmitz-Dräger BJ, Zeegers MP, Steineck G, Kogevinas M, Real FX, Malats N. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J Urol*. 2007 Jun;25(3):285-95.
13. Egbers L, Grotenhuis AJ, Aben KK, Alfred Witjes J, Kiemeny LA, Vermeulen SH. The prognostic value of family history among patients with urinary bladder cancer. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):1117-24. doi: 10.1002/ijc.29062. Epub 2014 Jul 9.
14. Green J, Banks E, Berrington A, Darby S, Deo H, Newton R. N-acetyltransferase 2 and bladder cancer: an overview and consideration of the evidence for gene-environment interaction. *Br J Cancer*. 2000 Aug;83(3):412-7.
15. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, Compton C, Brierley J, Groome PA. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer*. 2014 Jul 15;135(2):371-8.
16. Chalasani V, Chin JL, Izawa JJ. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. *Can Urol Assoc J*. 2009 Dec;3(6 Suppl 4):S193-8.
17. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):106-119. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.028. Epub 2016 Mar 17
18. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Conference Committee. *Am J Surg Pathol*. 1998 Dec;22(12):1435-48.

19. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol.* 2007 Apr;51(4):889-97; discussion 897-8. Epub 2006 Oct 27.
20. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, Torres A, Watson R, Kurth KH. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology.* 2005 Dec;66(6 Suppl 1):90-107.
21. Lamm DL. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am.* 1992 Aug;19(3):499-508.
22. Lamm DL, Herr H, Jakse G, Kuroda M, Mostofi FK, Okajima E, Sakamoto A, Sesterhenn I, da Silva FC. Updated concepts and treatment of carcinoma in situ. *Urol Oncol.* 1998 Jul-Oct;4(4-5):130-8.
23. Nolte-Ernsting C, Cowan N. Understanding multislice CT urography techniques: Many roads lead to Rome. *Eur Radiol.* 2006 Dec;16(12):2670-86. Epub 2006 Sep 5.
24. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol.* 2009 Jun;22 Suppl 2:S53-9. doi: 10.1038/modpathol.2008.193.
25. Raitanen MP, Aine R, Rintala E, Kallio J, Rajala P, Juusela H, Tammela TL; FinnBladder Group. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol.* 2002 Mar;41(3):284-9.
26. Kurth KH, Schellhammer PF, Okajima E, Akdas A, Jakse G, Herr HW, Calais da Silva F, Fukushima S, Nagayama T. Current methods of assessing and treating carcinoma in situ of the bladder with or without involvement of the prostatic urethra. *Int J Urol.* 1995 Jun;2 Suppl 2:8-22.
27. van der Aa MN, Steyerberg EW, Bangma C, van Rhijn BW, Zwarthoff EC, van der Kwast TH. Cystoscopy revisited as the gold standard for detecting bladder cancer recurrence: diagnostic review bias in the randomized, prospective CEFUB trial. *J Urol.* 2010 Jan;183(1):76-80. doi: 10.1016/j.juro.2009.08.150.
28. van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol.* 2005 Jun;47(6):736-48. Epub 2005 Mar 23.

29. Lotan Y, Shariat SF, Schmitz-Dräger BJ, Sanchez-Carbayo M, Jankevicius F, Racioppi M, Minner SJ, Stöhr B, Bassi PF, Grossman HB
Considerations on implementing diagnostic markers into clinical decision making in bladder cancer. *Urol Oncol.* 2010 Jul-Aug;28(4):441-8. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.11.004.
30. Yutkin V, Nisman B, Pode D.
Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance? *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010 Jun;10(6):787-90. doi: 10.1586/era.10.75.
31. Mariappan P, Zachou A, Grigor KM. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *Eur Urol.* 2010 May;57(5):843-9. doi: 10.1016/j.eururo.2009.05.047. Epub 2009 Jun 6
32. Gupta NP, Saini AK, Dogra PN, Seth A, Kumar R. Bipolar energy for transurethral resection of bladder tumours at low-power settings: initial experience. *BJU Int.* 2011 Aug;108(4):553-6. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09903.x. Epub 2010 Dec 22.
33. Baltacı S, Bozlu M, Yıldırım A, Gökçe Mİ, Tinay İ, Aslan G, Can C, Türkeri L, Kuyumcuoğlu U, Mungan A. Significance of the interval between first and second transurethral resection on recurrence and progression rates in patients with high-risk non-muscle-invasive bladder cancer treated with maintenance intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int.* 2015 Nov;116(5):721-6. doi: 10.1111/bju.13102. Epub 2015 May 11.
34. Král M, Hradil D, Kudláčková Š, Vidlář A, Študent V. Nové možnosti diagnostiky a predikce prognózy nádorů močového měchýře. *Urol. praxi*, 2017; 18(2): 64-68
35. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, Nabi G, Boachie C, Cook JA, Fraser C, Griffiths TR
Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care.* 2011 Jan;27(1):3-10. doi: 10.1017/S0266462310001364. Epub 2011 Jan 25.

36. Burger M, Grossman HB, Droller M, Schmidbauer J, Hermann G, Drăgoescu O, Ray E, Fradet Y, Karl A, Burgués JP, Witjes JA, Stenzl A, Jichlinski P, Jocham D. Photodynamic diagnosis of non-muscle-invasive bladder cancer with hexaminolevulinate cystoscopy: a meta-analysis of detection and recurrence based on raw data. *Eur Urol.* 2013 Nov;64(5):846-54. doi: 10.1016/j.eururo.2013.03.059. Epub 2013 Apr 8.
37. Cauberg EC, Kloen S, Visser M, de la Rosette JJ, Babjuk M, Soukup V, Pesl M, Duskova J, de Reijke TM. Narrow band imaging cystoscopy improves the detection of non-muscle-invasive bladder cancer. *Urology.* 2010 Sep;76(3):658-63. doi: 10.1016/j.urology.2009.11.075. Epub 2010 Mar 12.
38. Oosterlinck W, Kurth KH, Schröder F, Bultinck J, Hammond B, Sylvester R. A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group randomized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *J Urol.* 1993 Apr;149(4):749-52.
39. Sylvester RJ, Oosterlinck W, Holmang S, Sydes MR, Birtle A, Gudjonsson S, De Nunzio C, Okamura K, Kaasinen E, Solsona E, Ali-El-Dein B, Tatar CA, Inman BA, N'Dow J, Oddens JR, Babjuk M. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol.* 2016 Feb;69(2):231-44. doi: 10.1016/j.eururo.2015.05.050. Epub 2015 Jun 16.
40. Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Huguet-Pérez J. Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. *J Urol.* 2000 Oct;164(4):1183-7.
41. Čermák A, Pacík D, Vít V. Kontinentní a inkontinentní derivace moči, měchýř šetřící postupy. *Urol List* 2012; 10(3): 34-43
42. Svobodová J. Vakcinační kmen *Mycobacterium bovis* BCG a očkování proti tuberkulóze. *ZPRÁVY CENTRA EPIDEMIOLOGIE A MIKROBIOLOGIE (SZÚ, PRAHA)* 2014; 23(5)
43. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine.* 1999 Feb 26;17(7-8):915-22.

44. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2002 Nov;168(5):1964-70.
45. Pearl R. Cancer and tuberculosis. *Am J Hygiene.* 1929;9:97-159.
46. Zbar B, Bernstein ID, Bartlett GL, Hanna MG Jr, Rapp HJ. Immunotherapy of cancer: regression of intradermal tumors and prevention of growth of lymph node metastases after intravesical injection of living *Mycobacterium bovis*. *J Natl Cancer Inst.* 1972 Jul;49(1):119-30.
47. Coe JE, Feldman DJ. Extracutaneous delayed hypersensitivity, particularly in the guinea-pig bladder *Immunology.* 1966 Feb; 10(2): 127–136.
48. Bloomberg SD, Brosman SA, Hausman MS, Cohen A, Battenberg JD. The effects of BCG on the dog bladder. *Invest Urol.* 1975 May;12(6):423-7.
49. Morales A, Eiding D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976 Aug;116(2):180-3.
50. Lamm DL, Thor DE, Harris SC, Reyna JA, Stogdill VD, Radwin HM. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer. *J Urol.* 1980 Jul;124(1):38-40.
51. Drake T, Hicks J. BCG in bladder cancer: The morales of the story. *Eur Urol Suppl* 2014;13:e334.
52. Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol.* 2008 Jan;179(1):53-6. Epub 2007 Nov 13.
53. Kavoussi LR, Brown EJ, Ritchey JK, Ratliff TL. Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response. *J Clin Invest.* 1990 Jan;85(1):62-7.
54. Luo Y, Chen X, O'Donnell MA. Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN-gamma production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine.* 2003 Jan 7;21(1):17-26.

55. Matoušková M. Imunoterapie uroteliálního karcinomu močového měchýře-od BCG vakcíny k cílené imunoterapii. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 4S95–4S102
56. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E, Solsona E, Di Stasi SM, Witjes JA. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2009 Aug; 56(2):247-56. doi: 10.1016/j.eururo.2009.04.038. Epub 2009 Apr 24.
57. Han RF, Pan JG. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology.* 2006 Jun; 67(6):1216-23.
58. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD. Intravesical bacillus Calmette-Guérin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials. *BJU Int.* 2004 Mar; 93(4):485-90.
59. Böhle A, Jocham D, Bock PR Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *Urol.* 2003 Jan; 169(1):90-5.
60. Zlotta AR, van Vooren JP, Huygen K, Drowart A, Decock M, Pirson M, Jurion F, Palfliet K, Denis O, Simon J, Schulman CC. What is the optimal regimen for BCG intravesical therapy? Are six weekly instillations necessary? *Eur Urol.* 2000 Apr; 37(4):470-7.
61. Oddens J, Brausi M, Sylvester R, Bono A, van de Beek C, van Andel G, Gontero P, Hoeltl W, Turkeri L, Marreaud S, Collette S, Oosterlinck W. Final results of an EORTC-GU cancers group randomized study of maintenance bacillus Calmette-Guérin in intermediate- and high-risk Ta, T1 papillary carcinoma of the urinary bladder: one-third dose versus full dose and 1 year versus 3 years of maintenance. *Eur Urol.* 2013 Mar;63(3):462-72. doi: 10.1016/j.eururo.2012.10.039. Epub 2012 Nov 2.

62. Martínez-Piñeiro L, Portillo JA, Fernández JM, Zabala JA, Cadierno I, Moyano JL, Solsona E, Unda M, Beardo P, Rodríguez-Molina J, Chantada V, Palou J, Muntañola P, Alonso Dorrego JM, Pérez-García FJ, Silva JM, Chesa N, Montesinos M, Ojea A, Madero R, Martínez-Piñeiro JA. Maintenance Therapy with 3-monthly Bacillus Calmette-Guérin for 3 Years is Not Superior to Standard Induction Therapy in High-risk Non-muscle-invasive Urothelial Bladder Carcinoma: Final Results of Randomised CUETO Study 98013. *Eur Urol*. 2015 Aug;68(2):256-62. doi: 10.1016/j.eururo.2015.02.040. Epub 2015 Mar 18.
63. Herr HW, Milan TN, Dalbagni G. BCG-refractory vs. BCG-relapsing non-muscle-invasive bladder cancer: a prospective cohort outcomes study. *Urol Oncol*. 2015 Mar;33(3):108.e1-4. doi: 10.1016/j.urolonc.2014.02.020.
64. Takenaka A, Yamada Y, Miyake H, Hara I, Fujisawa M. Clinical outcomes of bacillus Calmette-Guérin instillation therapy for carcinoma in situ of urinary bladder. *Int J Urol*. 2008 Apr;15(4):309-13. doi: 10.1111/j.1442-2042.2008.02012.x.
65. Kaasinen E, Wijkström H, Malmström PU, Hellsten S, Duchek M, Mestad O, Rintala E. Alternating mitomycin C and BCG instillations versus BCG alone in treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder: a nordic study. *Eur Urol*. 2003 Jun;43(6):637-45.
66. Solsona E, Iborra I, Ricós JV, Monrós JL, Dumont R, Almenar S. Extravesical involvement in patients with bladder carcinoma in situ: biological and therapy implications. *J Urol*. 1996 Mar;155(3):895-9; discussion 899-900.
67. Daniels MJ, Barry E, Schoenberg M, Lamm DL, Bivalacqua TJ, Sankin A, Kates M. Contemporary oncologic outcomes of second induction course BCG in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *Urol Oncol*. 2019 Jun 26. pii: S1078-1439(19)30218-2. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.05.018. [Epub ahead of print]
68. Herr HW¹, Dalbagni G. Defining bacillus Calmette-Guérin refractory superficial bladder tumors. *J Urol*. 2003 May;169(5):1706-8.
69. Zahoor H, Mir MC, Barata PC, Stephenson AJ, Campbell SC, Fergany A, Dreicer R, Garcia JA. Phase II trial of continuous treatment with sunitinib in patients with high-risk (BCG-refractory) non-muscle invasive bladder cancer. *Invest New Drugs*. 2019 Dec;37(6):1231-1238. doi: 10.1007/s10637-018-00716-w. Epub 2019 Jun 24.

70. Mangrud OM, Waalen R, Gudlaugsson E, Dalen I, Tasdemir I, Janssen EA, Baak JP. Reproducibility and prognostic value of WHO1973 and WHO2004 grading systems in TaT1 urothelial carcinoma of the urinary bladder. *PLoS One*. 2014 Jan 7;9(1):e83192. doi: 10.1371/journal.pone.0083192. eCollection 2014.
71. Sengiku A, Ito M, Miyazaki Y, Sawazaki H, Takahashi T, Ogura K. A prospective comparative study of intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy with the Tokyo or Connaught strain for nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol*. 2013 Jul;190(1):50-4. doi: 10.1016/j.juro.2013.01.084. Epub 2013 Jan 30.
72. Brausi M, Oddens J, Sylvester R, et al. Side effects of bacillus Calmette-Guerin (BCG) in the treatment of intermediate and high risk Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder: results of EORTC Genito-Urinary Cancer Group randomised phase 3 study comparing one-third dose with full dose and 1 year with 3 years of maintenance BCG. *Eur Urol* 2014; 65(1):69-76.
73. SUKL, SPC přípravku BCG-MEDAC PRÁŠEK SUS. K INSTILACI DO MOČ. MĚCHÝŘE S ROZP.(online)(cit:12.9.2018).Dostupnéz:<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.hpd?kod=0185261>
74. Oddens JR, Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, van de Beek C, van Andel G, de Reijke TM, Prescott S, Alfred Witjes J, Oosterlinck W. Increasing age is not associated with toxicity leading to discontinuation of treatment in patients with urothelial non-muscle-invasive bladder cancer randomised to receive 3 years of maintenance bacille Calmette-Guérin: results from European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group study 30911. *BJU Int*. 2016 Sep;118(3):423-8. doi: 10.1111/bju.13474. Epub 2016 Apr 2.
75. Babjuk M, Soukup V. Intravezikální léčba povrchových nádorů močového měchýře. *Urolog. pro Praxi*, 2004; 3: 116-120
76. Lamm DL¹, van der Meijden PM, Morales A, Brosman SA, Catalona WJ, Herr HW, Soloway MS, Steg A, Debruyne FM. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J Urol*. 1992 Mar;147(3):596-600.
77. Palou J, Rodríguez-Villamil L, Andreu-Crespo A, Salvador-Bayarri J, Vicente-Rodríguez J. Intravesical treatment of severe bacillus Calmette-Guerin cystitis. *Int Urol Nephrol*. 2001;33(3):485-9.

78. Falkensammer C, Gozzi C, Hager M, Maier H, Bartsch G, Hörtl L, Rehder P. Late occurrence of bilateral tuberculous-like epididymo-orchitis after intravesical bacille Calmette-Guérin therapy for superficial bladder carcinoma. *Urology*. 2005 Jan;65(1):175.
79. Kabukari K, Sugino K, Sekiya M, Takai Y, Shibuya K, and Homma S. Miliary Tuberculosis that Developed after Intravesical Bacillus Calmette-Guerin Therapy. *Intern Med*. 2017 Jun 15; 56(12): 1563–1567.doi: 10.2169/internalmedicine.56.8055
80. Calleris G, Marra G, Corcione S, Oderda M, Cardellino C, Audagnotto S, Frea B, De Rosa FG, Gontero P. Miliary pulmonary infection after BCG intravesical instillation: a rare, misdiagnosed and mistreated complication. *Infez Med*. 2017 Dec 1;25(4):366-370.
81. Rodríguez F, Palou J, Martínez R, Rodríguez O, Rosales A, Huguet J, Villavicencio H. [Practical guideline for the management of adverse events associated with BCG installations]. *Arch Esp Urol*. 2008 Jun;61(5):591-6.
82. Talbot EA, Perkins MD, Silva SF, Frothingham R. Disseminated bacille Calmette-Guérin disease after vaccination: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1997 Jun;24(6):1139-46.
83. Batista M, Alves C, Boinas C, Camacho E. Tuberculosis Miliary in Patients Treated With Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy: Case Report. *J Med Cases*. 2017;8(7):233-235doi: <https://doi.org/10.14740/jmc2862w>
84. Witjes JA, Paulo J, Soloway M, Lamm D, Kamat AM, Brausi M. Clinical practice recommendations for the prevention and management of intravesical therapy-associated adverse events. *Eur Urol Suppl* 2008 Oct;7(10):667-76.
85. Elkabani M, Gree JN, Vincent AL, VanHook S, Sandin RL. Disseminated *Mycobacterium bovis* after intravesicular bacillus calmette-Guerin treatments for bladder cancer. *Cancer Control* 2000; 7:476
86. Nechanská B, Zaplatílek J, Pabišta R, Zdražilová O. Miliární BCG – pneumonitida: vzácná komplikace intravezikální terapie BCG. *Ces Urol* 2019, 23(2):140-148
87. Masopust J. Epigenetické alterace a jejich klinický význam. *Labor aktuell: časopis pro klienty Roche Diagnostics v České a Slovenské republice*. Praha: Roche, 2003. ISSN 1214-7672.

88. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, Newling DW, Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7. Epub 2006 Jan 17.
89. Chmelarova M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Beranek M, Palicka V. Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer. *Clin Transl Oncol.* 2013 Feb;15(2):160-3. doi: 10.1007/s12094-012-0894-z. Epub 2012 Jul 19.
90. Chmelařová M, Křepinská E, Spaček J, Laco J, Nekvindová J, Palička V. Methylation analysis of tumour suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA. *Folia Biol (Praha).* 2012;58(6):246-50.
91. Pavicic W, Perkiö E, Kaur S, Peltomäki P. Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol Med.* 2011;17(7-8):726-35. doi: 10.2119/molmed.2010.00239. Epub 2011 Feb 9
92. Dvorakova E, Chmelarova M, Laco J, Palicka V, Spacek J. Methylation analysis of tumor suppressor genes in endometrioid carcinoma of endometrium using MS-MLPA. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013 Dec;157(4):298-303. doi: 10.5507/bp.2013.035. Epub 2013 May 29.
93. Husek P, Pacovsky J, Chmelarova M, Podhola M, Brodak M. Methylation status as a predictor of intravesical Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy response of high grade non-muscle invasive bladder tumor. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017 Jun;161(2):210-216. doi: 10.5507/bp.2017.008. Epub 2017 Mar 22.
94. van der Meijden AP, Sylvester RJ, Oosterlinck W, Hoeltl W, Bono AV; EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Group. Maintenance Bacillus Calmette-Guerin for Ta T1 bladder tumors is not associated with increased toxicity: results from a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Group Phase III Trial. *Eur Urol.* 2003 Oct;44(4):429-34.

95. Kulkarni GS, Hakenberg OW, Gschwend JE, Thalmann G, Kassouf W, Kamat A, Zlotta A. An updated critical analysis of the treatment strategy for newly diagnosed high-grade T1 (previously T1G3) bladder cancer. *Eur Urol.* 2010 Jan;57(1):60-70. doi: 10.1016/j.eururo.2009.08.024. Epub 2009 Sep 1.
96. Cabello MJ, Grau L, Franco N, Orenes E, Alvarez M, Blanca A, Heredero O, Palacios A, Urrutia M, Fernández JM, López-Beltrán A, Sánchez-Carbayo M. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *J Mol Diagn.* 2011 Jan;13(1):29-40. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.008. Epub 2010 Dec 23.
97. García-Baquero R, Puerta P, Beltran M, Alvarez-Mújica M, Alvarez-Ossorio JL, Sánchez-Carbayo M. Methylation of tumor suppressor genes in a novel panel predicts clinical outcome in paraffin-embedded bladder tumors. *Tumour Biol.* 2014 Jun;35(6):5777-86. doi: 10.1007/s13277-014-1767-6. Epub 2014 Feb 28.
98. Ibragimova I, Dulaimi E, Slifker MJ, Chen DY, Uzzo RG, Cairns P. A global profile of genes promoter methylation in treatment-naïve urothelial cancer. *Epigenetics.* 2014
99. Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA. Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2473-6.
100. Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002 Feb;8(2):464-70.
101. Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Cheng JC, Toma MI, Hulan H, Jones PA, Liang G. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005 Nov;41(17):2769-78. Epub 2005 Oct 19.
102. Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, Patterson J, Cross SS, Feeley KM, Stephenson Y, Meuth M, Catto JW. Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J Pathol.* 2006 Jul;209(3):336-43.

103. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC, Catto JW. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1;13(7):2046-53.
104. Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaitė K, Suziedelis K, Mutanen P, Husgafvel-Pursiainen K. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology.* 2008;75(3-4):145-51. doi: 10.1159/000158665. Epub 2008 Sep 29.
105. Wolff EM, Chihara Y, Pan F, Weisenberger DJ, Siegmund KD, Sugano K, Kawashima K, Laird PW, Jones PA, Liang G. Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):8169-78. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1335. Epub 2010 Sep 14.
106. Agundez M, Grau L, Palou J, Algaba F, Villavicencio H, Sanchez-Carbayo M. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *Eur Urol.* 2011 Jul;60(1):131-40. doi: 10.1016/j.eururo.2011.04.020. Epub 2011 Apr 16.
107. Alvarez-Múgica M, Fernández-Gómez JM, Cebrian V, Fresno F, Escaf S, Sánchez-Carbayo M. Polyamine-modulated factor-1 methylation predicts Bacillus Calmette-Guérin response in patients with high-grade non-muscle-invasive bladder carcinoma. *Eur Urol.* 2013 Feb;63(2):364-70. doi: 10.1016/j.eururo.2012.05.050. Epub 2012 Jun 5.
108. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.* 2001 Dec 15;61(24):8659-63.
109. López F, Sampedro T, Llorente JL, Domínguez F, Hermsen M, Suárez C, Alvarez-Marcos C. Utility of MS-MLPA in DNA methylation profiling in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2014 Apr;50(4):291-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.01.003. Epub 2014 Jan 18.

110. Jiang D, Hong Q, Shen Y, Xu Y, Zhu H, Li Y, Xu C, Ouyang G, Duan S. The diagnostic value of DNA methylation in leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 May 8;9(5):e96822. doi: 10.1371/journal.pone.0096822. eCollection 2014.
111. Ozdemir F, Altinisik J, Karateke A, Coksuer H, Buyru N. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Exp Ther Med*. 2012 Dec;4(6):1092-1096. Epub 2012 Sep 18.
112. Xing M, Wang X¹, Palmai-Pallag T, Shen H, Helleday T, Hickson ID, Ying S. Acute MUS81 depletion leads to replication fork slowing and a constitutive DNA damage response. *Oncotarget*. 2015 Nov 10;6(35):37638-46. doi: 10.18632/oncotarget.5497.