

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Role s těhotenstvím asociovaných proteinů a dalších biochemických
markerů v diagnostice a sledování nádorů ledvin**

**Role of Pregnancy-associated Proteins and other Biomarkers in
Diagnostics and Prediction of Prognosis of Renal Cell Carcinoma**

Marcela Čechová

Praha, 2022

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Experimentální chirurgie na *Urologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole*.

Školitel: *prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc., Urologická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole*

Konzultant: *prof. MUDr. Marta Kalousová, Ph.D., Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy*

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Experimentální chirurgie dne v odhod.
Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:

Prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc., I. chirurgická klinika – břišní, hrudní a úrazové chirurgie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice

Děkan fakulty: *prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.*

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

OBSAH

1. ÚVOD	5
1.1. Renální karcinom	5
1.2. S těhotenstvím asociované proteiny ve vztahu k RCC	7
1.2.1. S těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A (PAPP-A)	7
1.2.1.1. Polymorfismus genu <i>PAPP-A</i>	8
1.2.2. Placentární růstový faktor (PIGF).....	9
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE DISERTAČNÍ PRÁCE	10
3. METODIKA	12
4. VÝSLEDKY.....	16
5. DISKUSE	21
6. ZÁVĚR	25
7. SOUHRN/SUMMARY	27
8. POUŽITÁ LITERATURA	30
9. PUBLIKAČNÍ AKTIVITA DOKTORANDA	37

Role s těhotenstvím asociovaných proteinů a dalších biochemických markerů v diagnostice a sledování nádorů ledvin

Abstrakt

Práce se zabývá rolí vybraných s těhotenstvím asociovaných proteinů, s těhotenstvím asociovaného plazmatického proteinu A (PAPP-A) a placentálního růstového faktoru (PIGF), ve vztahu k renálnímu karcinomu (RCC) a možnosti jejich použití jako biomarkerů tohoto onemocnění. Teoretická část práce shrnuje zásadní poznatky o RCC se zaměřením na prognostické faktory této malignity a poskytuje ucelený přehled známých potenciálních biomarkerů. V experimentální části práce byly hodnoceny sérové koncentrace PAPP-A a PIGF u pacientů operovaných pro světlobuněčný RCC a jejich potenciální přínos v diagnostice a hodnocení prognózy nemocných s tímto nejčastějším histologickým subtypem RCC. Dále byl zkoumán vztah jednonukleotidových polymorfismů genu *PAPP-A* [C/G SNP (rs13290387) a Cys327Cys SNP (rs12375498)] k nejčastějším histologickým subtypům RCC (světlobuněčný, papilární typ I a II, chromofóbní) a onkocytomu. Na základě našich výsledků se PAPP-A nezdá být vhodným markerem pro diagnostiku ani hodnocení prognózy nemocných s ccRCC, ovšem PIGF se jeví jako potenciální diagnostický a prognostický marker tohoto onemocnění. Genetickou analýzou jsme zjistili u nemocných s papilárním RCC typ II v porovnání s kontrolami vyšší výskyt mutantní alely G C/G SNP genu *PAPP-A*, výsledky tak ukazují na možnou souvislost mezi zkoumaným polymorfismem a rizikem vzniku tohoto histologického subtypu RCC.

Klíčová slova

Biomarker, PAPP-A, placentální růstový faktor, PIGF, polymorfismus *PAPP-A*, prognóza, renální karcinom, s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A, světlobuněčný renální karcinom

Role of Pregnancy-associated Proteins and other Biomarkers in Diagnostics and Prediction of Prognosis of Renal Cell Carcinoma

Abstract

The work describes the role of pregnancy-associated proteins, pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) and placental growth factor (PlGF), in relation to renal cell carcinoma (RCC) and their possible use as biomarkers of this tumour. The theoretical part of the thesis summarizes the essential knowledge of RCC focused on prognostic factors of this malignancy and provides a comprehensive overview of potential biomarkers. In the experimental part serum concentrations of PAPP-A and PlGF in patients operated for clear cell RCC were evaluated and their potential value in diagnostics and prediction of prognosis of subjects with this most frequent histological subtype of RCC was assessed. Furthermore, the thesis evaluates the relation of selected single nucleotide polymorphisms of *PAPP-A* gene [C/G SNP (rs13290387) a Cys327Cys SNP (rs12375498)] to the most common histological subtypes of RCC (clear cell, papillary I and II type, chromophobe) and oncocytoma. Based on our results, PAPP-A does not seem to be a suitable marker for diagnosis or evaluation of prognosis in patients with ccRCC, however, PlGF appears to be a potential diagnostic and prognostic marker of this disease. Genetic analysis showed in patients with papillary RCC type II, compared to controls, a higher occurrence of the mutant G allele C/G SNP of *PAPP-A*, results indicate a possible association between studied polymorphism and the risk of developing this histological subtype of RCC.

Key words

Biomarker, clear cell renal cell carcinoma, PAPP-A, *PAPP-A* polymorphism, placental growth factor, PlGF, pregnancy associated plasma protein A, prognosis, renal cell carcinoma

1. ÚVOD

1.1. Renální karcinom

Renální karcinom (RCC) představuje téměř 3 % všech solidních nádorových onemocnění v dospělosti (Siegel RL. et al., 2020). Incidence RCC v České republice se dlouhodobě řadí k nejvyšším ve světě (Dušek L. et al., data aktuální k roku 2018).

RCC vychází z kůry ledvin a histologicky se jedná o heterogenní skupinu tumorů. Převládajícím typem, který prokazujeme až v 80 % případů, je světlobuněčný RCC (ccRCC). Méně časté histologické varianty jsou papilární karcinom (pRCC) (12 % případů), chromofóbní karcinom (chRCC) (5 % případů) a další vzácnější subtypy (Moch H. et al., 2016; Ljungberg B. et al., 2022).

RCC je jedním z nejmalignějších nádorů urogenitálního traktu a jeho průběh je obtížně predikovatelný. Toto onemocnění probíhá ve většině případů až do pozdních stádií zcela asymptomaticky, což znesnadňuje jeho odhalení. V současnosti je RCC asi v 65 % případů zachycen jako náhodný nález na zobrazovacích vyšetřeních provedených pro jiné obtíže pacienta (Siegel RL. et al., 2020). Ovšem i přes narůstající podíl incidentálních tumorů bývá RCC až u jedné třetiny nemocných diagnostikován jako pokročilé onemocnění (Ljungberg B. et al., 2022). U více než 15 % nemocných jsou v době diagnózy přítomné metastázy (Siegel RL. et al., 2020).

V léčbě lokalizovaného RCC je zásadní časné stanovení diagnózy a kompletní chirurgické odstranění tumoru. Chirurgický výkon je jedinou kurativní léčbu této malignity. U stádia T1 upřednostňujeme resekční výkon, který poskytuje excelentní funkční i onkologické výsledky. Nefrektomie představuje vhodný operační výkon u vyšších stádií RCC. S recidivou se ale setkáváme u 20-40 % nemocných po kurativní chirurgické léčbě původně lokalizovaného onemocnění (Speed JM. et al., 2017).

V léčbě metastatického onemocnění je vždy ke zvážení metastazektomie, která může být kurativní. Chemoterapie, radioterapie ani hormonální léčba nejsou u RCC účinné. Základem systémové léčby nemocných s metastatickým ccRCC je

v současné době imunoterapie. Cílená léčba kinázovými inhibitory nebo monoklonálními protilátkami prodlužuje přežití, zlepšuje symptomy nemoci, přesto však není kurativní. Pokroky v systémové léčbě přispěly ke zlepšení prognózy, u části nemocných k významně dlouhodobé remisi onemocnění, bohužel ale i nadále nejsou u non-respondérů dostačující (Ljungberg B. et al., 2022).

Celkové 5leté přežití (over-all survival, OS) činí u RCC 49 % (Ljungberg B. et al., 2022). Včasné stanovení diagnózy a přesnější predikce individuálního průběhu onemocnění s identifikací nemocných s vysokým rizikem recidivy mohou pomoci ke snížení mortality RCC. Postupně byla popsána celá řada prognostických faktorů tohoto onemocnění. Nejdůležitějšími i nadále zůstávají staging onemocnění (dle klasifikace TNM) a jaderný grade. Aktuálně je k dispozici řada multivariantních prognostických modelů, které poskytují lepší predikci průběhu onemocnění než samotné anatomické a histologické prognostické faktory. Základem těchto modelů je staging onemocnění a histologické charakteristiky tumoru (především jaderný grade, případně přítomnosti intratumorální nekrózy) v kombinaci s běžně dostupnými laboratorními a klinickými parametry. Souběžně v posledních desetiletích probíhá snaha o identifikaci dalších potenciálních biomarkerů, které by mohly vést ke zpřesnění těchto prognostických modelů či pomoci v diagnostice.

Jako potenciální biomarkery RCC jsou nejčastěji uváděny karboanhydráza IX, VEGF (vascular endothelial growth factor), HIF (hypoxia inducible factor), PTEN (phosphatase and tensin homolog), Ki67, p53, p21, E-kadherin, osteopontin a další cytokiny, růstové faktory a proteiny regulující buněčný cyklus. Nekódující RNA představuje novou, zajímavou skupinu možných biomarkerů. Souběžně probíhá intenzivní výzkum genové exprese v tumoru (Ljungberg B. et al., 2022).

Studium biomarkerů má zásadní význam. Dosavadní výzkum v této oblasti přinesl zlepšení porozumění procesu kancerogeneze, nejen u RCC, a současně pomohl identifikovat cílová místa pro systémovou léčbu. Nevedl však k identifikaci biomarkeru vhodného pro časnou diagnostiku RCC. Většinu biomarkerů lze použít

spíše k predikci prognózy. Přidání některých biomarkerů vedlo ke zlepšení přesnosti prognostických modelů, ale validační studie chybí. Užití žádného biomarkeru doposud nebylo doporučeno pro klinickou praxi (Ljungberg B. et al., 2022).

1.2. S těhotenstvím asociované proteiny ve vztahu k RCC

Pro fyziologický růst a vývoj plodu je zásadní vytvoření dobře fungující fetoplacentární jednotky. Již v časně fázi embryonálního vývoje placenta produkuje celou řadu proteinů, které lze zjistit v krvi matky. Významné proteiny, které se v současné době využívají při vyšetření v graviditě jsou s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A (pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A) a placentární růstový faktor (placental growth factor, PlGF). Oba tyto proteiny byly původně popsány u gravidních žen a představují významné regulátory růstu a proliferace, uplatňující se zejména při angiogenezi v embryonálním vývoji (Boldt HB. et Conover CA., 2007). Stanovení hladiny PAPP-A se běžně používá v rámci primotrimestrálního screeningu chromozomálních vad plodu, PlGF se užívá k časnému stanovení rizika rozvoje preeklampsie.

K expresi těchto proteinů dochází i mimo graviditu, kdy se podílí na reparaci a regeneraci tkání. Ovšem hrají roli také v patologických stavech, jakým je i proces kancerogeneze (Autiero M. et al., 2003; Parr C. et al., 2005; Alexiadis M. et al, 2006; Bulut I. et al., 2009). Studium vybraných s těhotenstvím asociovaných proteinů ve vztahu k RCC bylo předmětem experimentální části disertační práce.

1.2.1. S těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A (PAPP-A)

PAPP-A je enzym ze skupiny zinkových metaloproteáz. PAPP-A aktivuje signální dráhu IGF-1 (insuline like growth factor), která se fyziologicky podílí na regulaci růstu, metabolismu, přežívání a diferenciaci buněk. Hlavním substrátem PAPP-A jsou vazebné proteiny na IGF. Proteolýzou těchto inhibičních proteinů PAPP-A

zvyšuje dostupnost IGF-1, který se váže na IGF-1 receptor (IGF-1R) (Boldt HB. et Conover CA., 2007).

PAPP-A je exprimován především v průběhu gravidity v placentárním syncytiotrofoblastu a je nezbytný pro normální fetální růst a vývoj (Boldt HB. et Conover CA., 2007). Mimo těhotenství se PAPP-A podílí na procesu hojení, revaskularizace či kostní remodelace. Současně však PAPP-A hraje roli v řadě patologických procesů, jako ateroskleróza či ruptura ateromového plátu. Sérová koncentrace PAPP-A byla identifikována jako možný biomarker akutních koronárních syndromů (von Haehling S. et al., 2013).

Role PAPP-A v procesu kancerogeneze byla intenzivně studována. U řady neoplázií, včetně karcinomu plic, prsu, vaječníků či Ewingova sarkomu byla popsána zvýšená sérová koncentrace PAPP-A. Navíc bylo zjištěno, že nadměrná exprese PAPP-A v nádorové tkáni podporuje růst nádoru a koreluje tak s jeho vyšší agresivitou a horší prognózou nemocných (Bulut I. et al., 2009; Boldt HB. et Conover CA., 2011; Mansfield AS. et al., 2014; Heitzeneder S. et al., 2019).

O roli PAPP-A ve vztahu k RCC není známo mnoho informací, role IGF-1 i nadměrná exprese IGF-1R byla nicméně v procesu kancerogeneze RCC opakovaně potvrzena (Parker A. et al., 2003; Ahmad N. et al., 2004; Tracz AF. et al., 2016).

1.2.1.1. Polymorfismus genu *PAPP-A*

Gen kódující PAPP-A je lokalizován na 9q33.1 (Silahtaroglu AN et al., 1993). Doposud bylo identifikováno několik tisíc polymorfismů v různých oblastech tohoto genu (NCBI, 2022).

Genetický polymorfismus je definován jako existence více než jedné alely v tomtéž lokusu alespoň u 1 % sledované populace. Nejjednodušším je jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism, SNP). Synonymní polymorfismy nemají vliv na kódovanou aminokyselinu, v případě záměny aminokyseliny se jedná

o nesynonymní polymorfismus. Polymorfismus v nekódující oblasti genu může ovlivňovat například mRNA splicing či vazbu transkripčních faktorů. SNP je podkladem téměř 90 % všech genetických mutací u lidí (Brookes AJ., 1999).

Doposud bylo publikováno málo prací, které se polymorfismem genu *PAPP-A* zabývají. V roce 2006 vyšla studie popisující korelaci polymorfismu Ser1224Tyr (rs7020782) s opakovanými potraty (Suzuki K. et al., 2006). O rok později byla alela C SNP C/G (rs13290387) definována jako nezávislý rizikový faktor akutního infarktu myokardu (Park S. et al., 2007). Spojitost TT genotypu SNP Cys327Cys (rs12375498) s rizikem preeklampsie byla prokázána českými vědci (Muravská A. et al., 2011). Shodný SNP Cys327Cys (rs12375498) byl identifikován i jako faktor ovlivňující OS u dlouhodobě dialyzovaných (Kalousová M. et al., 2014).

Genovým polymorfismem *PAPP-A* ve vztahu k RCC se dosud nezabývala žádná studie.

1.2.2. Placentární růstový faktor (PlGF)

PlGF představuje protein z rodiny růstových faktorů VEGF, které se uplatňují ve vývoji a růstu vaskulárního a lymfatického endotelu, a to především během prenatálního vývoje (Melincovici CS. et al., 2018). Původně byl PlGF popsán v lidské placentě, kde je produkován buňkami trofoblastu (Maglione D. et al., 1991). V dospělosti se PlGF uplatňuje při reparačních a regeneračních procesech. U zdravých jedinců jsou koncentrace PlGF nízké, k jejich nárůstu dochází za patologických stavů, jakými jsou hypoxie, zánět nebo kancerogeneze (Autiero M. et al., 2003; Fischer C. et al., 2008). Zvýšená exprese PlGF byla prokázána u řady tumorů. Současně byl PlGF identifikován jako biomarker nádorové progresy, kdy vyšší exprese koreluje s pokročilejším stádiem tumoru, jeho zvýšenou vaskularizací, přítomností metastáz a horší prognózou nemocných (Chen CN. et al., 2004; Parr C. et al., 2005; Wei SC. et al., 2005; Ho MC. et al., 2007; Song N. et al., 2015).

Role PlGF u RCC nebyla zatím zcela objasněna. Dosavadní výzkum ukazuje, že v hypervaskularizované tkáni RCC je zjizitelná zvýšená exprese PlGF, která koreluje s vyšší agresivitou tumoru (Takahashi A. et al., 1994; Matsumoto K. et al., 2003).

2. HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

2.1. Význam sérových koncentrací PAPP-A v diagnostice a stanovení prognózy u pacientů s ccRCC

Hypotéza:

PAPP-A je proteolytický enzym, který degradací inhibičních vazebných proteinů zvyšuje biologickou dostupnost IGF-1 a aktivací jím spouštěné signální dráhy se podílí na regulaci buněčného metabolismu, růstu, diferenciaci a přežívání. Význam PAPP-A v procesu kancerogeneze byl popsán u řady malignit, přičemž výsledky dosavadního výzkumu ukazují na korelaci zvýšené tkáňové exprese a sérové koncentrace PAPP-A s vyšší agresivitou tumoru a horší prognózou nemocných. Význam PAPP-A u RCC nebyl doposud objasněn. Rovněž se žádná studie nezabývala hodnocením jeho sérových hladin u nemocných s touto malignitou. Role IGF-1 a nadměrná exprese IGF-1R byla nicméně potvrzena v procesu kancerogeneze u RCC opakovaně.

Na základě těchto poznatků předpokládáme zvýšení sérových koncentrací PAPP-A u nemocných s ccRCC a korelaci vyšších sérových hladin s horším stadiem onemocnění a jaderným gradem nádoru. V průběhu sledování pak předpokládáme vyšší koncentrace PAPP-A u nemocných s rizikem relapsu po chirurgické léčbě.

Cíle práce:

- Zhodnotit sérové koncentrace PAPP-A u nemocných s ccRCC a jejich korelaci se stagingem onemocnění a jaderným gradem nádoru.

- Posoudit potenciální přínos sérové koncentrace PAPP-A v diagnostice ccRCC a vliv na prognózu nemocných s touto malignitou.

2.2. Genetická analýza polymorfismů genu *PAPP-A* u nemocných s RCC a onkocytomem

Hypotéza:

PAPP-A hraje zásadní roli v regulaci buněčného růstu a proliferace a jeho role v procesu kancerogeneze byla potvrzena u řady tumorů. Význam polymorfismů genu *PAPP-A* byl zjištěn u řady onemocnění a patologických stavů. Genovým polymorfismem *PAPP-A* ve vztahu k RCC se dosud nezabývala žádná studie.

Vyslovujeme hypotézu, že existuje souvislost mezi polymorfismy genu *PAPP-A* a rizikem vzniku RCC.

Cíle práce:

- Zhodnotit vztah dvou vybraných SNP genu *PAPP-A* [C/G SNP (rs13290387) a Cys327Cys SNP (rs12375498)] k riziku vzniku nejčastějších histologických subtypů RCC – ccRCC, pRCC (typ I a II), chRCC a dále onkocytomu.
- V podskupině nemocných s ccRCC zhodnotit vztah vybraných polymorfismů genu *PAPP-A* ke stadiu onemocnění a jadernému gradu nádoru a současně vyhodnotit jejich vliv na prognózu nemocných.

2.3. Význam sérových koncentrací PlGF v diagnostice a stanovení prognózy nemocných s ccRCC

Hypotéza:

PlGF je protein z rodiny růstových faktorů VEGF. PlGF hraje zásadní roli v regulaci angiogeneze zejména v průběhu prenatálního vývoje. Uplatňuje se však i v patologických situacích, jakými jsou hypoxie, ateroskleróza či kancerogeneze. Význam PlGF v procesu kancerogene byl opakovaně potvrzen u řady tumorů.

Současně byla sérová koncentrace i tkáňová exprese PlGF identifikována jako možný biomarker nádorové progresy, kdy vyšší exprese je spojena s pokročilejším stadiem nádoru, jeho zvýšenou vaskularizací a horší prognózou. Role PlGF u RCC nebyla doposud zcela objasněna. Dosud publikovaná data ukazují, že zvýšená exprese PlGF je zjizitelná v hypervaskularizované tkáni tumoru a je spojena s jeho horším biologickým chováním.

Na základě těchto poznatků předpokládáme zvýšení sérových koncentrací PlGF u nemocných s ccRCC a jejich korelaci s horším stadiem onemocnění a jaderným gradem nádoru. V průběhu sledování pak předpokládáme vyšší koncentrace PlGF u nemocných s rizikem relapsu onemocnění po chirurgické léčbě.

Cíle práce:

- Zhodnotit sérové koncentrace PlGF u nemocných s ccRCC a jejich korelaci se stagingem onemocnění a jaderným gradem nádoru.
- Posoudit potenciální přínos sérové koncentrace PlGF v diagnostice ccRCC a vliv na prognózu nemocných s touto malignitou.

3. METODIKA

Sledovanou skupinu tvořili nemocní s RCC, kteří podstoupili operační výkon (resekce ledviny či nefrektomie) na Urologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole. Laboratorní analýzy byly provedeny na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

3.1. Metodika – experimentální práce I: Sérové koncentrace PAPP-A u ccRCC

Do studie bylo zařazeno 121 pacientů (78 mužů, 43 žen, průměrný věk 63,4±10,5 let) operovaných pro ccRCC v období od července 2011 do srpna 2015.

Nemocné jsme rozdělili do tří skupin: pacienti s lokalizovaným ccRCC bez relapsu (lccRCC, n = 80), pacienti s lokalizovaným ccRCC s následným relapsem (rccRCC, n = 26) a pacienti s primárně metastatickým onemocněním (mccRCC, n = 15).

Staging byl proveden dle aktuální klasifikace TNM, jaderný grade hodnocen dle Fuhrmanové. Všichni nemocní byli po operaci sledováni dle platných doporučení Evropské urologické společnosti (EAU), průměrná doba sledování činila 4,6 let.

U všech jsme předoperačně stanovili sérovou koncentraci PAPP-A, ve skupině pacientů s lccRCC (n = 23) a rccRCC (n = 14) ještě 3 týdny a 3 měsíce po operaci.

Kontrolní skupinu tvořilo 69 zdravých dobrovolníků (35 mužů, 34 žen, průměrný věk 58,1±4,7 let), bez předchozího onkologického onemocnění, u kterých jsme provedli základní uro-onkologický screening, včetně ultrazvukového vyšetření urogenitálního traktu, cytologického vyšetření moči a stanovení PSA u mužů.

Sérová koncentrace PAPP-A byla stanovena metodou TRACE při užití standardních kitů KRYPTOR-PAPP-A (Brahms GmbH, Thermo Fisher Scientific, Henningsdorf, Německo). Výsledky jsou vyjádřeny v mIU/l (1 IU/l je ekvivalentem 4500 ng/ml).

3.2. Metodika – experimentální práce II: Polymorfismus genu *PAPP-A*

Do studie bylo zařazeno 454 pacientů (302 mužů, 152 žen, průměrný věk 63±11 let), operovaných pro RCC v období od 4/2007 do 8/2015. Vyšetření preparátu prokázalo u 374 nemocných ccRCC (82,4 %), u 19 pRCC typ I (pIRCC) (4,2 %), u 14 pRCC typ II (pIIRCC) (3,1 %), u 12 chRCC (2,6 %) a u 35 onkocytom (7,7 %).

Staging onemocnění byl proveden podle aktuální klasifikace TNM, jaderný grade hodnocen dle Fuhrmanové. Všichni nemocní byli po chirurgickém výkonu sledováni dle doporučení EAU, průměrná doba sledování byla 7,1 roku. Během sledování došlo k relapsu u 58 (15,5 %) pacientů s ccRCC a 86 (22,9 %) pacientů zemřelo.

Kontrolní skupinu tvořilo 145 zdravých dobrovolníků (65 mužů, 80 žen, průměrný věk 49 ± 14 let) všichni bez předchozího onkologického onemocnění. Shodná kontrolní skupina byla použita v předchozí studii analýzy polymorfismů genu *PAPP-A* na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (Kalousová M. et al., 2014).

K analýze DNA byla krev odebrána do zkumavek s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Izolace DNA byla provedena pomocí AutoGen FLEX STAR dle pokynů výrobce. Vybrané polymorfismy *PAPP-A* byly analyzovány pomocí sekvenace DNA (Sangerovo sekvenování) postupem popsáným dle Muravská et al. (Muravská A. et al, 2011). Nejprve byly cílové úseky DNA obsahující polymorfnní místa amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tyto fragmenty byly následně pročištěny (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel, Germany) a podrobeny další PCR s přidáním fluorescenčně značených dideoxynukleotid trifosfátů. Tyto fragmenty byly následně sekvenovány dle pokynů výrobce v sekvenátoru CEQTM 8000 (Beckman Coulter, USA).

3.3. Metodika – experimentální práce III: Sérové koncentrace PlGF u ccRCC

Do studie bylo zařazeno 49 pacientů (30 mužů, 19 žen, průměrný věk $62,9 \pm 10,6$ let) operovaných pro ccRCC v období od června 2011 do června 2013.

Nemocní byli rozděleni do tří podskupin: pacienti s lokalizovaným ccRCC bez dalšího relapsu (lccRCC, n = 31), pacienti s lokalizovaným ccRCC s relapsem 6 až 18 měsíců po chirurgickém výkonu (rccRCC, n = 8) a pacienti s primárně metastatickým onemocněním (mccRCC, n = 10).

Staging onemocnění byl proveden podle aktuální klasifikace TNM, jaderný grade byl hodnocen dle Fuhrmanové. Všichni nemocní byli po chirurgickém výkonu sledováni dle doporučení EAU, průměrná doba sledování činila 4,4 let. Během sledování došlo k relapsu u 8 (podskupina rccRCC) a 17 subjektů zemřelo.

U všech pacientů byla stanovena sérová koncentrace PIGF před operací, u nemocných s původně lokalizovaným onemocněním ještě 3 měsíce po operaci (podskupiny lccRCC, n = 31; rccRCC, n = 8).

Kontrolní skupinu tvořilo 38 zdravých dobrovolníků odpovídajícího věku i zastoupení pohlaví, všichni bez předchozího onkologického onemocnění po negativním uro-onkologickém screeningu (viz metodika experimentální práce I).

Sérová koncentrace PIGF byla stanovena metodou ELISA za použití standardních souprav určených k provádění této analýzy (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Výsledky jsou uvedeny v pikogramech na mililitr (pg/ml).

3.4. Statistická analýza

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka (SD) pro spojité proměnné a v procentech pro kategorické proměnné. Pro spojité proměnné jsme rozdíly mezi dvěma skupinami hodnotili prostřednictvím nepárového Mannova-Whitneyova U testu nebo jednofaktorové analýzy rozptylu (oneway ANOVA test). Pro analýzu spojitých proměnných v čase jsme použili test ANOVA s opakovanými měřeními.

V experimentální práci III jsme ke zhodnocení rozdílu sérových hladin PIGF mezi jednotlivými skupinami použili ROC analýzu. Cut-off hodnota pro riziko detekce ccRCC či riziko relapsu byla určena jako hodnota s nejvyšším součtem senzitivity a specifity. Kvalita testu byla specifikována plochou pod křivkou (AUC).

K hodnocení přežití jsme použili Kaplanovu-Meierovu metodu a pro porovnání mezi podskupinami následně log-rank test. Univariační Coxova regresní analýza byla použita k hodnocení sérové hladiny studovaného potenciálního biomarkeru jako prediktoru nádorově specifického přežití (cancer-specific survival, CSS) a OS.

Hladina významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

4. VÝSLEDKY

4.1. Výsledky – experimentální práce I: Sérová koncentrace PAPP-A u ccRCC

Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl sérových koncentrací PAPP-A mezi pacienty s ccRCC a kontrolami ($8,74 \pm 3,5$ mIU/l vs. $8,24 \pm 2,3$ mIU/l; $p = 0,24$). Statisticky významný rozdíl v sérových koncentracích PAPP-A jsme nezjistili ani při rozdělení pacientů do jednotlivých podskupin – lccRCC ($8,76 \pm 3,7$ mIU/l), rccRCC ($8,72 \pm 3,1$ mIU/l) a mccRCC ($8,7 \pm 3,4$ mIU/l); $p = 0,99$. Rovněž jsme neprokázali vliv stadia onemocnění ani jaderného gradu na hodnoty PAPP-A ($p = 0,76$, resp. $p = 0,61$).

Ve skupině nemocných s původně lokalizovaným onemocněním nebyla statisticky významná ani dynamika sérových hladin PAPP-A ve vzorcích odebraných 3 týdny a 3 měsíce po operačním výkonu – u podskupiny lccRCC ($9,08 \pm 3,5$ mIU/l vs. $9,39 \pm 3,8$ mIU/l; $p = 1,00$) a podskupiny rccRCC ($8,27 \pm 3,2$ mIU/l vs. $9,33 \pm 3,1$ mIU/l; $p = 0,43$). Koncentrace PAPP-A znázorňuje tabulka (Tab. 1.).

Tab. 1. Sérové koncentrace PAPP-A

PAPP-A (mIU/l)	ccRCC			Kontrolní skupina
	8.74±3.5			
	lccRCC	rccRCC	mccRCC	
Předoperačně	8,76±3,7	8,72±3,1	8,7±3,4	
3 týdny po operaci	9,08±3,5	8,27±3,2		
3 měsíce po operaci	9,39±3,8	9,33±3,1		

Výsledky nejsou statisticky významné.

Neprokázali jsme žádný vliv předoperační ani pooperační (3 měsíce po výkonu) koncentrace PAPP-A na CSS či OS. Výsledky znázorňují tabulky (Tab. 2. a 3.).

Tab. 2. Nádorově specifické přežití (CSS) u pacientů s lokalizovaným ccRCC

	PAPP-A (mIU/l)	Počet pacientů	Relaps	HR (CI)	p hodnota
Předoperačně	< 8,2	53	14 (26,4 %)	1,08 (0,5-2,35)	0,84
	≥ 8,2	53	12 (22,2 %)		
3 měsíce po operaci	< 9,2	18	6 (33,3 %)	0,47 (0,16-1,37)	0,14
	≥ 9,2	19	8 (42,1 %)		

Výsledky nejsou statisticky významné.

Tab. 3. Celkové přežití (OS) u pacientů s lokalizovaným ccRCC

	PAPP-A (mIU/l)	Počet pacientů	Exitus	HR (CI)	p hodnota
Předoperačně	< 8,2	53	14 (26,4 %)	1,85 (0,8-4,29)	0,15
	≥ 8,2	53	8 (14,81 %)		
3 měsíce po operaci	< 9,2	18	5 (26,3 %)	0,59 (0,19-1,87)	0,38
	≥ 9,2	19	7 (38,9 %)		

Výsledky nejsou statisticky významné.

4.2. Výsledky – experimentální práce II: Polymorfismus genu *PAPP-A*

C/G SNP (rs13290387) genu *PAPP-A*

Genetická analýza ukázala statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypů C/G SNP (rs13290387) *PAPP-A* mezi pacienty s pIRCC v porovnání s kontrolami. Mutantní alelu G jsme detekovali u pIRCC v 60,7 % případů, u kontrol ve 38,3 % (OR 2,49; 1,13-5,52; p = 0,024). Podobně jsme zjistili vyšší frekvenci genotypu GG (28,6 % u pIRCC vs. 15,9 % u kontrol; GG vs. CC: OR 9,91; 1,05-93,5; p = 0,045) a GG + CG (92,3 % vs. 61,7 %; CG + GG vs. CC: OR 8,23; 1,05-64,65; p = 0,045).

U dalších histologickými subtypů RCC a onkocytomu jsme neprokázali významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypu C/G SNP (rs13290387) (p > 0,05). U nemocných s ccRCC jsme nezjistili žádný signifikantní rozdíl ve frekvenci alel nebo genotypů C/G SNP (rs13290387) *PAPP-A* v závislosti na stádiu onemocnění ani jaderném

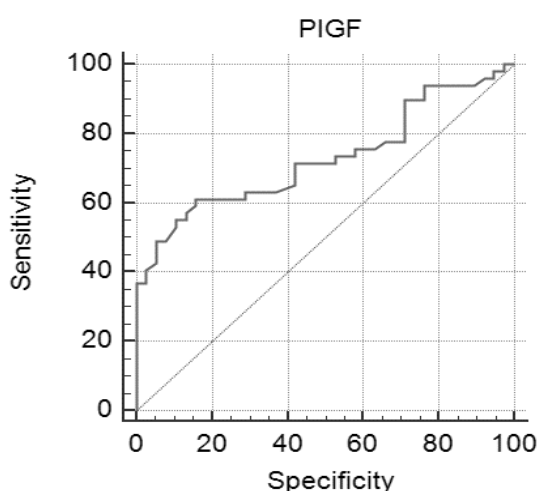
gradu ($p > 0,05$). Rovněž jsme neprokázali vliv zkoumaného polymorfismu na přežití nemocných ($p > 0,05$).

Cys327Cys SNP (rs12375498) *PAPP-A*

Genetická analýza neprokázala signifikantní rozdíl ve frekvenci alel a genotypů tohoto polymorfismu mezi zkoumanými subtypy RCC ani onkocytomem v porovnání s kontrolami ($p > 0,05$). U nemocných s ccRCC jsme nezjistili žádný významný rozdíl ve frekvenci alel nebo genotypů Cys327Cys SNP (rs12375498) v závislosti na stádiu onemocnění ani jaderném gradu ($p > 0,05$). Rovněž jsme neprokázali vliv zkoumaného polymorfismu na přežití nemocných ($p > 0,05$).

4.3. Výsledky – experimentální práce III: Sérová koncentrace PlGF u ccRCC

Prokázali jsme významně vyšší sérovou koncentraci PlGF u nemocných s ccRCC v porovnání s kontrolami ($16,1 \pm 10,5$ pg/ml vs. $10,5 \pm 2,4$ pg/ml; $p = 0,002$). Cut-off hodnotu koncentrace PlGF pro riziko ccRCC jsme stanovili na 12,71 pg/ml s AUC 0,729, vykazující specifickost 84,21 % a senzitivitu 61,22 % ($p = 0,0001$) (Obr. 1.).



Obr. 1. Cut-off hodnota koncentrace PlGF v séru pro riziko ccRCC

Cut-off hodnota koncentrace PlGF v séru pro riziko ccRCC $>12,71$ pg/mL (AUC 0,729, specifickost 84,21 %, senzitivita 61,22 %; $p = 0,0001$).

Předoperačně jsme popsali statisticky významný rozdíl v sérové koncentraci PIGF mezi podskupinami nemocných s lccRCC a mccRCC ($13,1 \pm 5,1$ pg/ml vs. $25,8 \pm 18,1$ pg/ml; $p = 0,002$). Nezjistili jsme žádný statisticky významný rozdíl hodnot mezi nemocnými s rccRCC a lccRCC nebo mccRCC. Rovněž jsme neprokázali korelaci sérové koncentrace PIGF se stádiem onemocnění (T1-T2 vs. T3-T4; $p = 0,76$) či jaderným gradem (G1-G2 vs. G3-G4; $p = 0,07$).

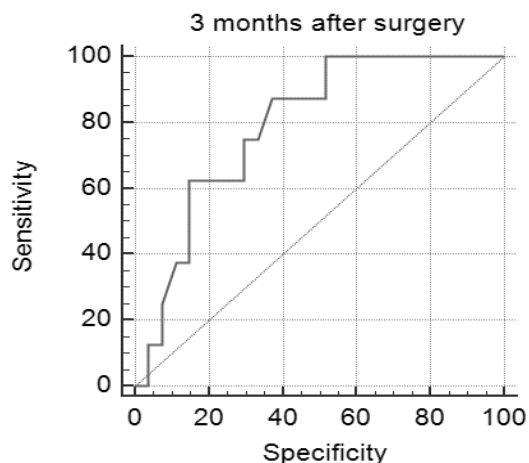
V odběrech provedených tři měsíce po operaci jsme popsali vyšší sérovou koncentraci PIGF v podskupině nemocných s následnou recidivou (rccRCC) v porovnání s nemocnými bez recidivy (lccRCC) ($14,87 \pm 2,96$ pg/ml vs. $12,1 \pm 5,4$ pg/ml), rozdíl nebyl statisticky významný ($p = 0,17$). Všechny výsledky sérových koncentrací PIGF ukazuje tabulka (Tab. 4.).

Tab. 4. Sérové koncentrace PIGF

PIGF (pg/mL)	ccRCC			Kontrolní skupina	<i>p</i> hodnota
Předoperačně	16,1±10,5			10,5±2,4	$p = 0,002$
	Podskupiny ccRCC				
	lccRCC	rccRCC	mccRCC		
Předoperačně	13,1±5,1	15,9±6,9	25,8±18,1	-----	lccRCC vs. mccRCC $p = 0,002^*$
3 měsíce po operaci	12,1±5,4	14,87±2,96	-----	-----	$p = 0,17$

*Předoperačně, koncentrace PIGF statisticky významně vyšší u mccRCC v porovnání s lccRCC ($p = 0,002$). Statisticky významný rozdíl mezi lccRCC vs. rccRCC, ani rccRCC vs. mccRCC jsme nezaznamenali.

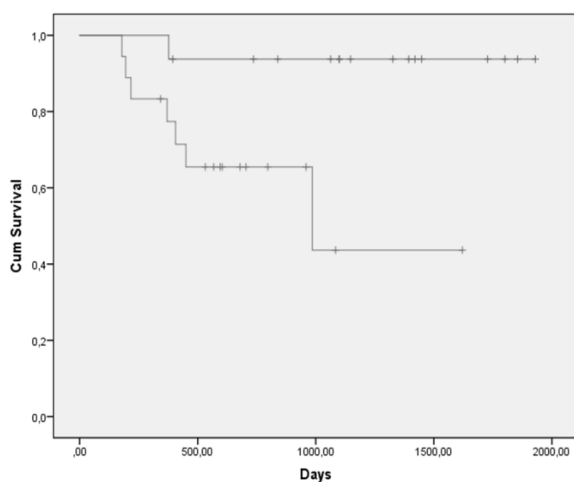
Cut-off hodnotu sérové koncentrace PIGF pro riziko relapsu jsme stanovili na 11,41 pg/ml s AUC 0,792, vykazující specificitu 62,96 % a senzitivitu 87,5 % ($p = 0,0003$) (Obr. 2).



Obr. 2. Cut-off hodnota sérové koncentrace PlGF pro riziko relapsu ccRCC

Cut-off hodnota PlGF pro riziko relapsu > 11,41 pg/mL (AUC 0,792, specifická 62,96 %, senzitivita 87,5 %, p = 0,0003).

Třileté CSS u pacientů s lokalizovaným ccRCC (podskupiny lccRCC a rccRCC) s koncentrací PlGF v séru pod hodnotou cut-off pro riziko relapsu (< 11,41 pg/ml) bylo 93 % vs. 61 % u nemocných se sérovou koncentrací PlGF nad hodnotou cut-off (> 11,41 pg/ml) (HR 7,997, CI 1,994-32,073; p = 0,018) (Obr. 3).



Obr. 3. Kaplan-Meierovy křivky 3letého nádorově specifického přežití (CSS)

Horní křivka – nemocní s koncentrací PlGF < 11,41 pg/ml, 3leté CSS 93 %; spodní křivka – nemocní s koncentrací PlGF > 11,41 pg/ml, 3leté CSS 61 %.

5. DISKUSE

5.1. Diskuse – experimentální práce I: Sérové koncentrace PAPP-A u ccRCC

PAPP-A je metaloproteáza, která degraduje inhibiční vazebné proteiny IGF-1, čímž zvyšuje jeho biologickou dostupnost. Stimulace IGF-1R vede ke zvýšení proliferace, iniciaci maligní transformace, dediferenciaci buněk a inhibici apoptózy (Seccareccia E. et al., 2012; Weroha SJ. et al., 2012). Souvislost mezi zvýšenými hladinami IGF-1, případně nadměrnou expresí IGF-1R, a rizikem rozvoje různých tumorů včetně karcinomu prsu, prostaty či ovaria prokázala řada studií (Roddam AW. et al., 2008; Belfiore A. and Frasca F., 2008; Key TJ. et al., 2010).

Role IGF-1 a IGF-1R byla potvrzena i u RCC (Tao Y. et al., 2007; Tracz AF. et al., 2016). Korelace zvýšené exprese IGF-1R s vyšším jaderným gradem a horší prognózou nemocných byla opakovaně potvrzena (Parker AS. et al., 2002; Parker AS. et al., 2003; Ahmad N. et al., 2004).

Doposud publikované výsledky naznačují, že PAPP-A se uplatňuje v procesu kancerogeneze u řady tumorů. Zvýšené sérové koncentrace PAPP-A byly popsány u nemocných s karcinomem plic (Bulut I. et al., 2009). Proteolytická aktivita PAPP-A navíc urychluje růst buněk karcinomu plic *in vivo* na myším modelu (Pan H. et al., 2012). Autoři Mansfield et al. prokázali zvýšenou expresi PAPP-A v buňkách karcinomu prsu, a to především u agresivnějších variant (Mansfield AS. et al., 2014). U ovariálního karcinomu nadměrná exprese PAPP-A podporuje nádorový růst, zvyšuje vaskularizaci a metastatický potenciál (Boldt HB. et Conover CA., 2011).

Ovlivnění proteolytické aktivity PAPP-A bylo zkoumáno i jako cíl protinádorové léčby. Podání monoklonální protilátky proti PAPP-A vede na myším modelu ke zpomalení růstu buněk karcinomu plic a ovaria (Mikkelsen JH. et al., 2014; Becker MA. et al., 2015). PAPP-A byl rovněž identifikován jako faktor zodpovědný na migraci buněk přispívající k tvorbě vzdálených metastáz u karcinomu prsu,

maligního mesoteliomu pleury a maligního melanomu (Boldt HB. et Conover CA., 2011; Huang J. et al., 2013; Prithviraj P. et al., 2015).

I přes intenzivní výzkum role PAPP-A u různých tumorů nebyl dosud jeho význam u RCC objasněn. Vycházeli jsme z poznatku, že PAPP-A zvyšuje biologickou dostupnost IGF-1, čímž aktivuje jeho signální dráhu, jejíž význam byl v procesu kancerogeneze RCC opakovaně potvrzen. Výsledky nenaplnily naše očekávání a hypotézy se nepodařilo potvrdit. V naší studijní kohortě jsme neprokázali významný rozdíl sérových koncentrací PAPP-A mezi nemocnými s ccRCC a kontrolami. Nezjistili jsme korelaci sérových koncentrací PAPP-A se stadiem onemocnění ani jaderný gradem. Rovněž dynamika pooperačních hladin PAPP-A nepřinesla žádné statisticky významné výsledky a neprokázali jsem ani žádný vliv PAPP-A na přežití. Na základě našich výsledků lze usuzovat, že sérová koncentrace PAPP-A se nezdá být vhodným biomarkerem pro diagnostiku ani hodnocení prognózy u ccRCC.

5.2. Diskuse – experimentální práce II: Polymorfismus genu *PAPP-A*

Předpokládá se, že polymorfismy mohou ovlivňovat transkripci, splicing, transport a translaci mRNA (Goymer P., 2007). Význam polymorfismů genu *PAPP-A* byl zjištěn u řady onemocnění a patologických stavů. U specifických polymorfismů genu *PAPP-A*, rs7020782 a rs12375498 byla identifikován korelace s rizikem opakovaných potratů, rozvojem gestačního diabetes mellitus, tvorbou ateromových plátů či rizikem cerebrovaskulárních onemocnění (Suzuki K. et al., 2006; Wang H. et al., 2012; Zhou S. et al., 2015; Bøtkjær JA. et al., 2016). Publikace českých autorů Muravská et al. rovněž ukazuje na korelaci polymorfismus rs12375498 s rizikem rozvoje preeklampsie (Muravská A. et al., 2011). Současně byl tento polymorfismus identifikován i jako nezávislý faktor ovlivňující OS u nemocných na dlouhodobé dialyzační terapii (Kalousová M. et al., 2014). V této práci autoři současně zkoumali vztah vybraného polymorfismu k sérovým koncentracím PAPP-A, kdy na velkém soboru nebyl prokázán vliv polymorfismus rs12375498 na sérovou koncentraci

PAPP-A (Kalousová M. et al., 2014). V další studii byla při genetické analýze C/G SNP (rs13290387) *PAPP-A* přítomnost mutantní alely C identifikována jako rizikový faktor akutního infarktu myokardu (Park S. et al., 2007).

Doposud nebyla publikována žádná práce zabývající se polymorfismy genu *PAPP-A* u RCC. Hodnotili jsme dva vybrané polymorfismů genu *PAPP-A* – C/G SNP (rs13290387) a Cys327Cys SNP (rs12375498) – ve vztahu k nejčastějším histologickým subtypům RCC a onkocytomu.

Popsali jsme statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypů C/G SNP (rs13290387) *PAPP-A* mezi pacienty s pIRCC a kontrolami. U pIRCC jsme popsali vyšší výskyt mutantní alely G a vyšší frekvenci genotypu GG a GG + CG.

U dalších histologickými subtypů RCC ani onkocytomu jsme nezjistili v porovnání s kontrolami žádný významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypů vybraných polymorfismů *PAPP-A*. Rovněž u nemocných s ccRCC jsme nezjistili žádný rozdíl ve frekvenci alel nebo genotypů zkoumaných polymorfismů, ani jsme neprokázali žádný vliv na přežití. Výsledky ukazují, že C/G SNP (rs13290387) ani Cys327Cys SNP (rs12375498) nesouvisí s rizikem vzniku ccRCC.

Výsledky genetické analýzy naznačují souvislost mezi C/G SNP (rs13290387) genu *PAPP-A* a rizikem rozvoje pIRCC. Limitací práce je malý počet nemocných s tímto histologickým subtypem RCC (n = 14), ověření na větším souboru je velmi žádoucí.

5.3. Diskuse – experimentální práce III: Sérové koncentrace PIGF u ccRCC

Angiogeneze hraje klíčovou roli v procesu kancerogeneze, nádorové progresi a schopnosti zakládat vzdálené metastázy. VEGF je považován za nejsilnější ze známých pro-angiogenních faktorů. PIGF řadíme do rodiny růstových faktorů VEGF a jeho zvýšená exprese je spojena především s patologickou angiogenezí. Zvýšené hladiny PIGF byly popsány u mnoha patologických stavů včetně nádorového růstu. Navíc, řada publikovaných prací prokázala, že vyšší sérová

koncentrace PlGF koreluje s horším biologickým chováním tumoru a jeho agresivitou. PlGF tak představuje potenciální prognostický biomarker řady nádorů – včetně karcinomu prsu, vaječníků, žaludku, jater, maligního mesoteliomu pleury, dále kolorektálního a nemalobuněčného bronchogenního karcinomu (Chen CN. et al., 2004; Parr C. et al., 2005; Wei SC. et al., 2005; Zhang L. et al., 2005; Ho MC. et al., 2007; Escudero-Esparza A. et al., 2009; Pompeo E. et al., 2009; Meng Q. et al., 2018).

Přesto, že byl PlGF intenzivně zkoumán jako možný nádorový biomarker u řady malignit, jeho význam u RCC nebyl doposud objasněn. Autoři Takahashi et al. jako první na malém souboru pacientů prokázali zvýšenou expresi VEGF i PlGF v hypervaskularizované nádorové tkáni a postulovali, že oba zkoumané růstové faktory přispívají k neovaskularizaci i u RCC (Takahashi A. et al., 1994). Další japonští autoři popsali korelaci hladin PlGF s T a M stádiem nádoru, jaderným gradem a vaskularizací tumoru. Současně potvrdili PlGF jako nezávislý prognostický faktor (Matsumoto K. et al., 2003).

Ve shodě s předchozími pracemi jsme prokázali vyšší sérovou koncentraci PlGF u nemocných s ccRCC v porovnání s kontrolami. Cut-off hodnotu koncentrace PlGF pro riziko ccRCC jsme stanovili na 12,71 pg/ml. Dle našich výsledků lze sérovou koncentraci PlGF považovat za potenciální biomarker pro detekci ccRCC. Ovšem vzhledem k AUC a dosaženým citlivostem testu lze uvažovat o užití PlGF spíše v rámci multi-markerového testu než jako samostatného biomarkeru.

Neprokázali jsme korelaci sérových koncentrací PlGF se stádiem nádoru či jaderným gradem. Přesto, že jsme pozorovali vyšší hodnoty PlGF u nemocných s tumory vykazující horší jaderný grade, rozdíly nedosáhly statistické významnosti (G1-G2 vs. G3-G4; $p = 0,07$). Důvodem mohl být malý počet nemocných při současném vyšším zastoupení tumorů nižšího stadiu i gradingu.

Ve vzorcích odebraných 3 měsíce po operaci jsme pozorovali vyšší koncentrace PlGF u nemocných s následnou recidivou (podskupina rccRCC) v porovnání

s nemocnými bez recidivy (podskupina lccRCC). Rozdíly nedosáhly statistické významnosti. Cut-off hodnotu sérové koncentrace PlGF pro riziko relapsu jsme stanovili na 11,41 pg/ml. Nemocní s koncentrací PlGF pod touto hodnotou vykazovali 3leté CSS 93 %, nemocní s koncentrací PlGF nad touto cut-off hodnotou pouze 61 %. Můžeme tedy postulovat, že sérová koncentrace PlGF se jeví jako potenciální prognostický biomarker ccRCC.

Hlavní limitací naší práce je malý počet nemocných v jednotlivých podskupinách. Další limitací je skutečnost, že jsme současně nezkoumali expresi PlGF v nádorové tkáni. Vezme-li se v potaz, že RCC nemá žádný vhodný diagnostický, ani prognostický biomarker, PlGF se jeví poměrně slibně. Je však zřejmé, že potvrzení našich výsledků je třeba provést na větší skupině nemocných.

6. ZÁVĚR

V práci jsme se zabývali studiem vybraných s těhotenstvím asociovaných proteinů a sice PAPP-A a PlGF jako potenciálních biomarkerů v diagnostice a hodnocení prognózy nemocných s RCC. Dále jsme hodnotili vybrané polymorfismy genu *PAPP-A* ve vztahu k nejčastějším histologickým typům RCC a onkocytomu.

V první části experimentální práce jsme hodnotili sérové koncentrace PAPP-A u nemocných operovaných pro ccRCC a jejich potenciální přínos pro diagnostiku a predikci prognózy. Výsledky nepotvrdily námi stanovenou hypotézu. Neprokázali jsme významný rozdíl sérových koncentrací PAPP-A u pacientů s ccRCC v porovnání s kontrolami. Rovněž jsme nezjistili závislost PAPP-A na stagingu onemocnění ani jaderném gradu. Ani dynamika PAPP-A ve vzorcích odebraných po operačním výkonu nebyla významná, nezjistili jsme její vliv na přežití. Na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že sérová koncentrace PAPP-A se nejeví jako potenciální diagnostický marker, ani jako prediktor prognózy u pacientů s ccRCC.

Ve druhé části práce jsme zkoumali souvislost vybraných polymorfismů genu *PAPP-A* s nejčastějšími histologickými subtypy RCC (ccRCC, pIRCC, pIIRCC a chRCC) a onkocytomem. Zde jsme zjistili statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypů C/G SNP (rs13290387) genu *PAPP-A* mezi pacienty s pIIRCC v porovnání s kontrolami. U dalších histologických subtypů RCC ani onkocytomu jsme žádné významné rozdíly ve frekvenci alel a genotypů v porovnání s kontrolní skupinou nezjistili. U ccRCC jsme nezjistili žádný statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel či genotypů vybraných SNP genu *PAPP-A* v závislosti na stádiu onemocnění či jaderném gradu a neprokázali jsme ani vliv zkoumaných polymorfismů na přežití. Naše výsledky naznačují možnou souvislost mezi C/G SNP (rs13290387) genu *PAPP-A* a rizikem rozvoje pIIRCC. Limitací práce je malý počet nemocných s tímto histologickým subtypem, ověření na větším souboru je nezbytné.

V rámci třetího experimentu jsme zkoumali význam sérových koncentrací PlGF u nemocných s ccRCC. U nemocných s ccRCC jsme zjistili významně vyšší sérové koncentrace PlGF v porovnání s kontrolami. Výsledky tak potvrdily naši hypotézu. Korelaci sérových hladin PlGF se stagingem onemocnění a jaderným gradem jsme ale nepotvrdili. Přesto, že jsme pozorovali vyšší hodnoty PlGF u nemocných s tumory vykazující horší jaderný grade, rozdíly nedosáhly statistické hladiny významnosti. V pooperačním sledování nemocných s lokalizovaným ccRCC jsme pozorovali vyšší koncentrace PlGF u nemocných, u nichž následně došlo k relapsu onemocnění v porovnání s těmi, u nichž relaps nenastal. Popsané rozdíly nicméně nedosáhly statistické významnosti. V experimentu jsme stanovili cut-off hodnotu sérové koncentrace PlGF pro riziko relapsu ccRCC, která korelovala s CSS. Z našich výsledků lze tedy usuzovat, že PlGF se jeví jako potenciální diagnostický a prognostický biomarker ccRCC, přičemž je ale nutné ověření výsledků na větší experimentální skupině.

Závěrem lze uvést, že PlGF, nikoli však PAPP-A, se jeví jako potenciálně vhodný marker pro diagnostiku a hodnocení prognózy nemocných s ccRCC. Pro verifikaci tohoto závěru je však nutné realizovat studie na větším souboru pacientů.

7.1. SOUHRN

RCC představuje 2-3 % všech malignit v dospělosti, incidence v ČR se navíc řadí k nejvyšším ve světě. Doposud nebyl identifikován žádný vhodný diagnostický, ani prognostický biomarker tohoto onemocnění. Disertační práce nabízí ucelený přehled prognostických faktorů RCC a dosud známých potenciálních biomarkerů.

V experimentální části práci jsme hodnotili dva potenciální biomarkery – PAPP-A a PlGF – jejich vztah k diagnostice a hodnocení prognózy nemocných s ccRCC. Dále jsme zkoumali vybrané polymorfismy genu *PAPP-A* ve vztahu k nejčastějším histologickým typům RCC a onkocytomu.

PAPP-A je proteáza regulující buněčný růst. Role PAPP-A v procesu kancerogeneze byla potvrzena u řady nádorů. Hodnotili jsme sérové koncentrace PAPP-A u nemocných s ccRCC (lokalizovaný ccRCC bez relapsu, lokalizovaný ccRCC s následným relapsem, primárně metastatické onemocnění). Nejistili jsme významný rozdíl hodnot PAPP-A u nemocných s ccRCC v porovnání s kontrolami, ani mezi podskupinami. Neprokázali jsme korelaci se stagingem ani jaderným gradem. Rovněž dynamika pooperačních hladin PAPP-A nebyla signifikantní. PAPP-A se nezdá být vhodným markerem pro diagnostiku ani hodnocení prognózy nemocných s ccRCC.

Analyzovali jsme vybrané SNP genu *PAPP-A* [C/G SNP (rs13290387) a Cys327Cys SNP (rs12375498)] u osob s ccRCC, pRCC typ I a II, chRCC a onkocytomem. U pRCC typ II byl v porovnání s kontrolami vyšší výskyt mutantní alely G C/G SNP *PAPP-A*. Výsledky ukazují na možnou souvislost mezi tímto polymorfismem a rizikem vzniku pRCC. U dalších histologických variant nebyl rozdíl ve frekvenci alel a genotypů zkoumaných polymorfismů *PAPP-A* zjištěn.

PlGF, klíčový aktivátor angiogeneze, byl identifikován jako prognostický biomarker u řady malignit. Analyzovali jsme sérové koncentrace PlGF u osob s ccRCC (lokalizovaný ccRCC bez relapsu, lokalizovaný ccRCC s následným relapsem, primárně metastatické onemocnění). Sérová hladina PlGF byla významně vyšší u

osob s ccRCC v porovnání s kontrolami ($p = 0,002$). Cut-off hodnota PIGF pro riziko detekce ccRCC byla stanovena na 12,71 pg/ml ($p = 0,0001$). Významný rozdíl předoperačních hodnot PIGF jsme zjistili mezi podskupinami lccRCC a mccRCC ($p = 0,002$). Mezi dalšími podskupinami jsme významné rozdíly nezjistili, rovněž jsme nezjistili korelaci se stagingem či gradingem nádoru. Pooperačně jsme pozorovali vyšší hladinu PIGF v podskupině s následnou recidivou v porovnání s nemocnými bez recidivy, ale rozdíl nebyl statisticky významný ($p = 0,17$). Cut-off hodnota PIGF pro riziko relapsu byla stanovena na 11,41 pg/ml ($p = 0,0003$). U osob s lokalizovaným ccRCC (lccRCC a rccRCC) s PIGF < 11,41 pg/ml bylo tříleté CSS 93 % vs. 61 % u nemocných s PIGF > 11,41 pg/ml ($p = 0,018$). PIGF se jeví jako potenciální diagnostický a prognostický biomarker ccRCC, ověření výsledků na větším souboru je nicméně nezbytné.

7.2. SUMMARY

RCC represents 2-3% of all adult malignancies with incidence in the Czech Republic among the highest in the world. No suitable diagnostic or prognostic biomarker of this tumour has been identified yet. The work presents an overview of prognostic factors of RCC and potential biomarkers known so far.

In experimental part, we evaluated the diagnostics and prognostic value of two potential biomarkers – PAPP-A and PIGF – in patients with ccRCC. Furthermore, we investigated certain polymorphisms of *PAPP-A* gene in relation to the most common histological types of RCC and oncocytoma.

PAPP-A is a protease regulating cell growth. Its role in the process of carcinogenesis has been confirmed in several tumours. We evaluated PAPP-A serum concentrations in subjects with ccRCC (localized ccRCC without relapse, localized ccRCC with further relapse, primary metastatic disease). No significant difference in PAPP-A serum concentration in subjects with ccRCC compared to controls was observed, nor between the subgroups. We did not find a correlation with staging or grading.

Also, dynamics of postoperative PAPP-A levels was not significant. PAPP-A appears not to be a suitable marker for diagnosis or evaluation of prognosis in patients with ccRCC.

Subsequently we analysed two SNPs of the *PAPP-A* gene [C/G SNP (rs13290387) and Cys327Cys SNP (rs12375498)] in subjects with ccRCC, pRCC type I and II, chRCC and oncocytoma. We observed a higher prevalence of mutant allele G C/G SNP of *PAPP-A* gene in pRCC type II compared to controls. These results indicate a possible link between the C/G SNP *PAPP-A* gene polymorphism and the risk of developing pRCC. In other histological subtypes, no difference in the frequency of allele and *PAPP-A* genotype was detected.

PIGF, a key activator of angiogenesis, has been identified as a prognostic biomarker in several malignancies. We analysed serum PIGF concentrations in subjects with ccRCC (localized ccRCC without relapse, localized ccRCC with further relapse, primary metastatic disease). PIGF serum level was significantly increased in subjects with ccRCC compared to controls ($p = 0.002$). The cut-off level of PIGF serum concentration for the risk of ccRCC was determined at 12.71 pg/ml ($p = 0.0001$). Preoperatively, significantly higher PIGF concentrations were detected in mcrRCC compared to lccRCC group ($p = 0.002$). No significant difference among other groups was observed, nor did we detect a correlation with tumour staging or grading. Postoperatively, higher PIGF concentration was observed in subgroup with further relapse compared to patients without relapse, not reaching the statistic significance ($p = 0.17$). The cut-off level of PIGF for the risk of relapse was established at 11.41 pg/ml ($p = 0.0003$). In subjects with localized ccRCC (lccRCC and rccRCC) with PIGF < 11.41 pg/ml, the 3-year CSS was 93% vs. 61% in patients with PIGF > 11.41 pg/ml ($p = 0.018$). PIGF appears to be a potential diagnostic and prognostic biomarker of ccRCC, however, validation of our results on a larger cohort is necessary.

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Ahmad N, Keehn CA, Coppola D. The expression of insulin-like growth factor-I receptor correlates with Fuhrman grading of renal cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2004 Sep;35(9):1132-6. doi: 10.1016/j.humpath.2004.05.012. PMID: 15343516.
2. Alexiadis M, Mamers P, Chu S, Fuller PJ. Insulin-like growth factor, insulin-like growth factor-binding protein-4, and pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human granulosa cell tumors. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Nov-Dec;16(6):1973-9. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00724.x. PMID: 17177834.
3. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost* 2003;1(7):1356-70. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00263.x. PMID: 12871269.
4. Becker MA, Haluska P Jr, Bale LK, Oxvig C, Conover CA. A novel neutralizing antibody targeting pregnancy-associated plasma protein-a inhibits ovarian cancer growth and ascites accumulation in patient mouse tumorgrafts. *Mol Cancer Ther.* 2015 Apr;14(4):973-81. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0880. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25695953; PMCID: PMC4394033.
5. Belfiore A, Frasca F. IGF and insulin receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008 Dec;13(4):381-406. doi: 10.1007/s10911-008-9099-z. Epub 2008 Nov 19. PMID: 19016312.
6. Boldt HB, Conover CA. Overexpression of pregnancy-associated plasma protein-A in ovarian cancer cells promotes tumor growth in vivo. *Endocrinology.* 2011 Apr;152(4):1470-8. doi: 10.1210/en.2010-1095. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21303951.
7. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res.* 2007 Feb;17(1):10-8. doi: 10.1016/j.ghir.2006.11.003. Epub 2007 Jan 10. PMID: 17218136.
8. Bøtkjær JA, Borgbo T, Kløverpris S, Noer PR, Oxvig C, Andersen CY. Effect of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) single-nucleotide polymorphisms on the level and activity of PAPP-A and the hormone profile in fluid from normal human small antral follicles. *Fertil Steril.* 2016

- Dec;106(7):1778-1786.e8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.008. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27793387.
9. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999 Jul 8;234(2):177-86. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00219-x. PMID: 10395891.
 10. Bulut I, Coskun A, Ciftci A, Cetinkaya E, Altiay G, Caglar T, Gulcan E. Relationship between pregnancy-associated plasma protein-A and lung cancer. *Am J Med Sci*. 2009 Apr;337(4):241-4. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31818967a3. PMID: 19365167.
 11. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, Gore JL, Sun M, Wood C, Russo P. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2019 Jan;75(1):74-84. doi: 10.1016/j.eururo.2018.08.036. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30243799; PMCID: PMC8397918.
 12. Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Cheng WF, Su YN, Chang KJ, Lee PH. The significance of placenta growth factor in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *Cancer Lett*. 2004 Sep 15;213(1):73-82. doi: 10.1016/j.canlet.2004.05.020. PMID: 15312686.
 13. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, 2005 [cit. 2022-1-06]. Available at: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802-8861.
 14. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol*. 2010 Jun;11(6):530-42. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70095-4. Epub 2010 May 14. PMID: 20472501; PMCID: PMC3113287.
 15. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer*. 2008 Dec;8(12):942-56. doi: 10.1038/nrc2524. PMID: 19029957.
 16. von Haehling S, Doehner W, Jankowska EA, Ponikowski P, Stellos K, Puntmann VO, Nagel E, Anker SD, Gawaz M, Bigalke B. Value of serum pregnancy-associated plasma protein A for predicting cardiovascular events among patients presenting with cardiac chest pain. *CMAJ*. 2013 Apr 16;185(7):E295-303. doi: 10.1503/cmaj.110647. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23509133; PMCID: PMC3626827.
 17. Heitzeneder S, Sotillo E, Shern JF, Sindiri S, Xu P, Jones R, Pollak M, Noer PR, Lorette J, Fazli L, Alag A, Meltzer P, Lau C, Conover CA, Oxvig C, Sorensen PH, Maris JM, Khan J, Mackall CL. Pregnancy-Associated Plasma

- Protein-A (PAPP-A) in Ewing Sarcoma: Role in Tumor Growth and Immune Evasion. *J Natl Cancer Inst.* 2019 Sep 1;111(9):970-982. doi: 10.1093/jnci/djy209. PMID: 30698726; PMCID: PMC6748813.
18. Ho MC, Chen CN, Lee H, Hsieh FJ, Shun CT, Chang CL, Lai YT, Lee PH. Placenta growth factor not vascular endothelial growth factor A or C can predict the early recurrence after radical resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2007 Jun 8;250(2):237-49. doi: 10.1016/j.canlet.2006.10.005. Epub 2006 Nov 29. PMID: 17137709.
 19. Huang J, Tabata S, Kakiuchi S, The Van T, Goto H, Hanibuchi M, Nishioka Y. Identification of pregnancy-associated plasma protein A as a migration-promoting gene in malignant pleural mesothelioma cells: a potential therapeutic target. *Oncotarget.* 2013 Aug;4(8):1172-84. doi: 10.18632/oncotarget.1126. PMID: 23896451; PMCID: PMC3787149.
 20. Kalousová M, Jáchymová M, Muravská A, Kuběna AA, Dusilová-Sulková S, Tesař V, Zima T. Cys327Cys polymorphism of the PAPP-A gene (pregnancy associated plasma protein A) is related to mortality of long term hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 2014 May;47(7-8):578-83. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.03.006. Epub 2014 Mar 22. PMID: 24667032.
 21. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bedke J, Capitanio U, Dabestani S, Fernández-Pello S, Giles RH, Hofmann F, Hora M, Klatte T, Kuusk T, Lam TB, Marconi L, Powles T, Tahbaz R, Volpe A, Bex A. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2022 Update. *Eur Urol.* 2022 Oct;82(4):399-410. doi: 10.1016/j.eururo.2022.03.006. Epub 2022 Mar 26. PMID: 35346519. Available at: <http://uroweb.org/guideline/renalcellcarcinoma/>.
 22. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):9267-71. doi: 10.1073/pnas.88.20.9267. PMID: 1924389; PMCID: PMC52695.
 23. Mansfield AS, Visscher DW, Hart SN, Wang C, Goetz MP, Oxvig C, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A expression in human breast cancer. *Growth Horm IGF Res.* 2014 Dec;24(6):264-7. doi: 10.1016/j.ghir.2014.10.007. PMID: 25468445; PMCID: PMC4308469.
 24. Matsumoto K, Suzuki K, Koike H, Okamura K, Tsuchiya K, Uchida T, Takezawa Y, Kobayashi M, Yamanaka H. Prognostic significance of plasma placental growth factor levels in renal cell cancer: an association with clinical characteristics and vascular endothelial growth factor levels. *Anticancer Res.* 2003 Nov-Dec;23(6D):4953-8. PMID: 14981951.

25. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455-467. PMID: 30173249.
26. Meng Q, Duan P, Li L, Miao Y. Expression of Placenta Growth Factor Is Associated with Unfavorable Prognosis of Advanced-Stage Serous Ovarian Cancer. *Tohoku J Exp Med.* 2018 Apr;244(4):291-296. doi: 10.1620/tjem.244.291. PMID: 29643276.
27. Mikkelsen JH, Resch ZT, Kalra B, Savjani G, Kumar A, Conover CA, Oxvig C. Indirect targeting of IGF receptor signaling in vivo by substrate-selective inhibition of PAPP-A proteolytic activity. *Oncotarget.* 2014 Feb 28;5(4):1014-25. doi: 10.18632/oncotarget.1629. PMID: 24572990; PMCID: PMC4011579.
28. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016 Jul;70(1):93-105. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.029. Epub 2016 Feb 28. PMID: 26935559.
29. Muravská A, Germanová A, Jáchymová M, Hájek Z, Svarcová J, Zima T, Kalousová M. Association of pregnancy-associated plasma protein A polymorphism with preeclampsia - a pilot study. *Clin Biochem.* 2011 Dec;44(17-18):1380-4. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.09.015. Epub 2011 Oct 2. PMID: 21986593.
30. National Center for Biotechnology Information, Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP) [online]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine [cit. 2022-5-25]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>.
31. Pan H, Hanada S, Zhao J, Mao L, Ma MZ. Protein secretion is required for pregnancy-associated plasma protein-A to promote lung cancer growth in vivo. *PLoS One.* 2012;7(11):e48799. doi: 10.1371/journal.pone.0048799. Epub 2012 Nov 9. PMID: 23152806; PMCID: PMC3494721.
32. Park S, Youn JC, Shin DJ, Park CM, Kim JS, Ko YG, Choi D, Ha JW, Jang Y, Chung N. Genetic polymorphism in the pregnancy-associated plasma protein-A associated with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2007 Sep;18(6):417-22. doi: 10.1097/MCA.0b013e328241d967. PMID: 17700210.
33. Parker AS, Cheville JC, Janney CA, Cerhan JR. High expression levels of insulin-like growth factor-I receptor predict poor survival among women with

- clear-cell renal cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2002 Aug;33(8):801-5. doi: 10.1053/hupa.2002.126186. PMID: 12203212.
34. Parker AS, Cheville JC, Lohse C, Cerhan JR, Blute ML. Expression of insulin-like growth factor I receptor and survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Urol.* 2003 Aug;170(2 Pt 1):420-4. doi: 10.1097/01.ju.0000071474.70103.92. PMID: 12853790.
35. Parr C, Watkins G, Boulton M, Cai J, Jiang WG. Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer. *Eur J Cancer.* 2005 Dec;41(18):2819-27. doi: 10.1016/j.ejca.2005.07.022. Epub 2005 Nov 4. PMID: 16275058.
36. Pompeo E, Albonici L, Doldo E, Orlandi A, Manzari V, Modesti A, Mineo TC. Placenta growth factor expression has prognostic value in malignant pleural mesothelioma. *Ann Thorac Surg.* 2009 Aug;88(2):426-31. doi: 10.1016/j.athoracsur.2009.04.038. PMID: 19632388.
37. Prithviraj P, Anaka M, McKeown SJ, Permezel M, Walkiewicz M, Cebon J, Behren A, Jayachandran A. Pregnancy associated plasma protein-A links pregnancy and melanoma progression by promoting cellular migration and invasion. *Oncotarget.* 2015 Jun 30;6(18):15953-65. doi: 10.18632/oncotarget.3643. PMID: 25940796; PMCID: PMC4599249.
38. Roddam AW, Allen NE, Appleby P, Key TJ, Ferrucci L, Carter HB, Metter EJ, Chen C, Weiss NS, Fitzpatrick A, Hsing AW, Lacey JV Jr, Helzlsouer K, Rinaldi S, Riboli E, Kaaks R, Janssen JA, Wildhagen MF, Schröder FH, Platz EA, Pollak M, Giovannucci E, Schaefer C, Quesenberry CP Jr, Vogelman JH, Severi G, English DR, Giles GG, Stattin P, Hallmans G, Johansson M, Chan JM, Gann P, Oliver SE, Holly JM, Donovan J, Meyer F, Bairati I, Galan P. Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies. *Ann Intern Med.* 2008 Oct 7;149(7):461-71, W83-8. doi: 10.7326/0003-4819-149-7-200810070-00006. PMID: 18838726; PMCID: PMC2584869.
39. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev.* 2007 Feb;28(1):20-47. doi: 10.1210/er.2006-0001. Epub 2006 Aug 24. PMID: 16931767.
40. Seccareccia E, Brodt P. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. *Growth Horm IGF Res.* 2012 Dec;22(6):193-9. doi: 10.1016/j.ghir.2012.09.003. Epub 2012 Oct 23. PMID: 23098677.

41. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020 Jan;70(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21590. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31912902.
42. Silahtaroglu AN, Tümer Z, Kristensen T, Sottrup-Jensen L, Tommerup N. Assignment of the human gene for pregnancy-associated plasma protein A (PAPPA) to 9q33.1 by fluorescence in situ hybridization to mitotic and meiotic chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 1993;62(4):214-6. doi: 10.1159/000133479. PMID: 7679961.
43. Song N, Liu H, Ma X, Zhang S. Placental growth factor promotes metastases of ovarian cancer through MiR-543-regulated MMP7. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(3):1104-12. doi: 10.1159/000430235. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26402225.
44. Soukup V, Čapoun O, Pešl M, Sobotka R, Vávřová L, Hanuš T, Zima T, Kalousová M. Placental Growth Factor in Bladder Cancer Compared to the Diagnostic Accuracy and Prognostic Performance of Vascular Endothelial Growth Factor A. *Anticancer Res.* 2018 Jan;38(1):239-246. doi: 10.21873/anticancer.12213. PMID: 29277778.
45. Speed JM, Trinh QD, Choueiri TK, Sun M. Recurrence in Localized Renal Cell Carcinoma: a Systematic Review of Contemporary Data. *Curr Urol Rep.* 2017 Feb;18(2):15. doi: 10.1007/s11934-017-0661-3. PMID: 28213859.
46. Suzuki K, Sata F, Yamada H, Saijo Y, Tsuruga N, Minakami H, Kishi R. Pregnancy-associated plasma protein-A polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 2006 Jun;70(1-2):99-108. doi: 10.1016/j.jri.2005.11.004. Epub 2006 Mar 15. PMID: 16540175.
47. Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Tobisu K, Kakizoe T, Tsukamoto T, Kumamoto Y, Sugimura T, Terada M. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res.* 1994 Aug 1;54(15):4233-7. PMID: 7518352.
48. Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, Deutsch E. Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007 Oct;4(10):591-602. doi: 10.1038/ncponc0934. PMID: 17898809.
49. Tracz AF, Szczylik C, Porta C, Czarnecka AM. Insulin-like growth factor-1 signaling in renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2016 Jul 12;16:453. doi: 10.1186/s12885-016-2437-4. PMID: 27405474; PMCID: PMC4942928.
50. Wang H, Song Y, Zhang C, Zhan J, Zhang R, Wang H. Genetic relationship between serum pregnancy-associated plasma protein-A gene polymorphism

- and ischemic cerebrovascular disease in a Northern Han Chinese population. *Neural Regen Res.* 2012 Mar 5;7(7):528-33. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.07.009. PMID: 25745440; PMCID: PMC4349000.
51. Wei SC, Tsao PN, Yu SC, Shun CT, Tsai-Wu JJ, Wu CH, Su YN, Hsieh FJ, Wong JM. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut.* 2005 May;54(5):666-72. doi: 10.1136/gut.2004.050831. PMID: 15831913; PMCID: PMC1774482.
52. Weroha SJ, Haluska P. The insulin-like growth factor system in cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012 Jun;41(2):335-50, vi. doi: 10.1016/j.ecl.2012.04.014. PMID: 22682634; PMCID: PMC3614012.
53. Zhang L, Chen J, Ke Y, Mansel RE, Jiang WG. Expression of Placenta growth factor (PlGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance. *World J Surg Oncol.* 2005 Oct 13;3:68. doi: 10.1186/1477-7819-3-68. PMID: 16223445; PMCID: PMC1276823.
54. Zhou S, Cui M, Yin Z, Li R, Zhu J, Zhou H. Correlation of single nucleotide polymorphisms in the pregnancy-associated plasma protein-A gene with carotid plaques. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015 Jun 30;15:60. doi: 10.1186/s12872-015-0041-1. PMID: 26122709; PMCID: PMC4485363.

9. PUBLIKAČNÍ AKTIVITA DOKTORANDA

9.1. Publikační aktivita doktoranda, která je podkladem disertace

Publikace *in extenso* v časopisech s IF

1. **Cechova M**, Chocholaty M, Babjuk M, Zima T, Havlova K, Koldova M, Schmidt M, Kalousova M. Diagnostic and prognostic value of placental growth factor serum concentration in clear cell renal cell carcinoma. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2021 Nov;165(4):375-379. doi: 10.5507/bp.2021.003. PMID: 33612835. (IF 1,648/2021)
2. **Cechova M**, Chocholaty M, Zima T, Babjuk M, Kalousova M. The Significance of Pregnancy-associated Plasma Protein A Serum Concentration in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Anticancer Res. 2019 Jun;39(6):3249-3253. doi: 10.21873/anticanres.13466. PMID: 31177175. (IF 1,994/2019)

Publikace *in extenso* v časopisech bez IF

1. **Čechová M**, Chocholaty M, Babjuk M, Kalousová M, Zima T. Prognostické faktory renálního karcinomu. Rozhl Chir. *in press*.

9.2. Publikační aktivita doktoranda bez přímého vztahu k tématu disertace

Publikace *in extenso* v časopisech s IF

1. Brisuda A, Háček J, **Čechová M**, Škapa P, Babjuk M. Diagnosis of urinary bladder urothelial carcinoma by immunocytology with p53, MCM5, MCM2 and Ki-67 antibodies using cell blocks derived from urine. Cytopathology. 2019 Sep;30(5):510-518. doi: 10.1111/cyt.12698. Epub 2019 May 20. PMID: 30943322. (IF 1,493/2019)
2. **Čechová M**, Pádr R, Hanek P, Chocholaty M. Spontaneous detumescence and full restoration of erection in a patient with high-flow priapism with persistent

- arterial-lacunar fistula after repeated selective embolisation-A case report. *Andrologia*. 2018 Aug;50(6):e13019. doi: 10.1111/and.13019. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29687468. (IF 1,840/2018)
3. Brisuda A, Háček J, **Čechová M**, Škapa P, Babjuk M. Clinical and cytopathological factors affecting the cellularity of urinary cell blocks and the implication for diagnosis and follow-up of urinary bladder urothelial carcinoma. *Cytopathology*. 2018 Dec;29(6):537-544. doi: 10.1111/cyt.12580. Epub 2018 Aug 13. PMID: 29873845. (IF 1,473/2018)
 4. **Čechová M**, Kříž J, Paulasová P, Chocholatý M. Penilní vibrostimulace u pacientů s míšním poraněním. *Cesk Slov Neurol*. 2015;78/111(2):200-204. (IF 0,209/2015)

Publikace *in extenso* v časopisech bez IF

1. **Čechová M**, Chocholatý M, Háček J, Schmidt M, Koldová M, Babjuk M. Zastoupení nekrózy v histologickém preparátu jako prediktor relapsu po chirurgické léčbě lokalizovaného světlobuněčného renálního karcinomu. *Rozhl Chir*. 2022;101(3): 114-118. doi: 10.33699/PIS.2022.101.3.114–118.
2. **Čechová M**, Matoušková M. Možnosti v léčbě močových infekcí v ordinaci praktického lékaře. *Med. praxi*. 2019;16(2):79-84.
3. Žemličková B, **Čechová M**. Benigní hyperplazie prostaty – aktuální možnosti farmakoterapie, rizika a limity spojené s léčbou. *Urol. praxi*. 2019;20(4):161-165.
4. Háček J, Brisuda A, **Čechová M**, Babjuk M. Korelace exprese markerů Ki-67, MCM2, MCM5 a p53 ve tkáních a cytoblocích u pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře. *Ces Urol*. 2019;23(1):36-42.
5. **Čechová M**. Možnosti léčby infekcí močových cest v ordinaci praktického lékaře. *Practicus* 2018;7:22-25.

6. Nekula M, Babjuk M, Chmelová R, **Čechová M**. Vzácný případ eosinofilní funikulitidy. Ces Urol. 2018;22(2):126-130.
7. **Čechová M**. Léčba benigní hyperplazie prostaty z pohledu praktického lékaře. Med. praxi. 2018;15(2):66-70.
8. **Čechová M**, Šturcová-Kaliská V, Matoušková M. Benigní hyperplazie prostaty – symptomatologie a léčba. Postgraduální medicína. 2017;6:638-643.
9. Novotná B, Svobodová L, **Čechová M**, Jarolím L, Chocholatý M, Bagryantseva Y, Macek Sr. M, Macek Jr. M. Naše první zkušenosti s využitím kometového testu při hodnocení integrity DNA ve spermích. Ces Urol. 2016;20(4):317-325.
10. Bittner L, Chocholatý M, **Čechová M**, Zima T, Grill R. Vliv volných radikálů na fertilitu muže a možnosti léčby. Ces Urol. 2015;19(1):11-18.
11. Chocholatý M, **Čechová M**. Rekonstrukční operace u lokalizovaného karcinomu penisu. Lékařské listy. 2014;10:5-6.
12. **Čechová M**, Chocholatý M. Erektální dysfunkce. Postgraduální medicína. 2014;16(8):871-878.

9.3. Vybrané přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních

- Central European Urological Society Meeting, Medical University of Vienna - webinar, 2021: Strategy for penile rehabilitation after radical prostatectomy.
- Jarní edukační urologické sympóziu (JEUS), Karlovy Vary, 2019: Erektální dysfunkce.
- EAU 17th Central European Meeting in conjunction with 63rd Annual Conference of the Czech Urological Society, Plzeň, 2017: Determination of Serum Level of PAPP-A in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma.
- EAU 17th Central European Meeting in conjunction with 63rd Annual Conference of the Czech Urological Society, Plzeň, 2017: Polymorphism of

Gene PAPP-A C/G SNP (rs13290387) and Cys327Cys SNP (rs12375498) in Patients with Renal Cell Carcinoma.

- 62. výroční konference České urologické společnosti, České Budějovice, 2016: Využití imunofenotypizace v cytologii moči pacientů s uroteliálním karcinomem močového měchýře metodika, pilotní výsledky.
- 61. výroční konference České urologické společnosti, Olomouc, 2015: Funkční výsledky chirurgické léčby male to female transsexualismu (MtF TS)
- 61. výroční konference České urologické společnosti, Olomouc, 2015: Podíl nekrózy v preparátu – rizikový faktor relapsu u nemocných po chirurgickém výkonu pro lokalizovaný světlobuněčný karcinom ledviny.
- EAU 15th Central European Meeting, Budapest, Hungary, 2015: Percent of microscopic tumor necrosis – a risk factor of recurrence in patients with localized clear cell renal cell carcinoma.
- III. konference sekce gynekologické sexuologie ČGPS ČSL JEP, Průhonice, 2015: Chirurgická konverze male to female u transsexuálů.
- IX. odborná konference a setkání spinálních jednotek a spinálních rehabilitačních jednotek, Harrachov, 2015: Penilní vibrostimulace u pacientů s míšním poraněním.
- 60. výroční konference České urologické společnosti, Brno, 2014: Fertility in Men with Spinal Cord Injury.
- 60. výroční konference České urologické společnosti, Brno, 2014: Konzervativní postup u nemocného s high-flow priapismem při přetrvávající intrakavernózní fistule po opakované superselektivní embolizaci.
- 60. výroční konference České urologické společnosti, Brno, 2014: Použití penilní vibrostimulace k získání ejakulátu u pacientů po míšním poranění
- EAU 14th Central European Meeting, Cracow, Poland, 2014: Penile vibrostimulation in Sperm Retrieval in Men with Spinal Cord Injury.
- 59. výroční konference České urologické společnosti, Karlovy Vary, 2013: Kazuistiky pacientů s lokálně pokročilým karcinomem penisu.

- EAU 13th Central European Meeting, Prague, 2013: Detection of Venous Leakage Using CT Cavernography in Men with Erectile Dysfunction.
- 58. výroční konference České urologické společnosti, Ostrava, 2012: Zhodnocení výsledků léčby seminomů na Urologické klinice 2. LF UK a FN Motol.

9.4. Abstrakta, monografie, kapitoly v učebnicích a sbornících

1. Matoušková M, Adámková V, **Čechová M**, Lahoda Brodská H. Konsenzuální postupy v léčbě močových infekcí. Praha: Solen, 2022.
2. **Čechová M**. Sexuální dysfunkce u mužů. In: Kříž J. et al. Poranění míchy. Příčiny, důsledky, organizace péče. Praha: Galén, 2019;209-223.
3. Büchler T, **Čechová M**, Herber O, Matoušková M. Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře - Léčba vybraných urologických onemocnění (2016). Všeobecné praktické lékařství. 2019;629-647.

Abstrakta jsou zahrnuta v podkapitole 9.3.