

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie



**MUDr. Marcela Čechová, FEBU**

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

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Konzultant: prof. MUDr. Marta Kalousová, Ph.D.

Praha, 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30. 10. 2022

Marcela Čechová

.....

Podpis autora

## Poděkování

Na tomto místě mi dovoluji poděkovat osobám, které mi byly při v průběhu postgraduálním studiu a psaní této práce velkou oporou a vzorem.

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli panu prof. Marku Babjukovi, který mě přijal jako sekundární lékařku v roce 2011 na Urologickou kliniku 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, umožnil mi zde získat cenné profesní a medicínské zkušenosti a vychoval ze mě urologa. Rovněž mu děkuji, že zaštil celé mé postgraduální studium.

Neméně, bych chtěla poděkovat paní prof. Martě Kalousové, své školitelce-konzultantce, za její podporu, vedení, trpělivost a veškerou pomoc jak během studia, tak při psaní všech publikací. Její cenné rady pro mě byly vždy zásadní a jsem jí za ně velice vděčná. Současně jí a pracovníkům Laboratoře pro komplexní výzkum nových biomarkerů Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK a VFN náleží veliké poděkování za realizaci laboratorních analýz.

Velké poděkování dále patří všem mým kolegům z Urologické kliniky 2. LF UK a FN Motol, díky kterým jsem se na tomto pracovišti vždy cítila vítána a v přátelském kolektivu. Speciální poděkování pak náleží dr. Matúšovi Chocholatému, jehož entuziasmus pro vědeckou činnost mě opravdu inspiroval a bylo mi vždy ctí společně realizovat jeho vědecké záměry. Jako můj školitel v předatestační přípravě byl mým velikým vzorem a vždy mi pomáhal ukazovat medicínskou i vědeckou cestu a byl mi vždy přítelem.

A konečně bych ráda poděkovala svým nejbližším, své rodině, partnerovi, dceři a rodičům za podporu a lásku.

# **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 a 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

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Akt	proteinkináza B (protein kinase B)
AUC	plocha pod ROC křivkou (area under the ROC curve)
CaIX	karboanhydráza IX (carbonic anhydrase IX)
ccRCC	světlobuněčný renální karcinom (clear cell renal cell carcinoma)
CEA	karcinoembryonální antigen (carcinoembryonic antigen)
CI	interval spolehlivosti (confidence interval)
CRP	C-reaktivní protein
CSS	nádorově specifické přežití (cancer specific survival)
DFS	přežití bez recidivy (disease free survival)
EAU	Evropská urologická společnost (European Association of Urology)
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GRANT	Grade, Age, Nodes and Tumour
HIF	hypoxií indukovaný faktor (hypoxia inducible factor)
HIF-1 $\alpha$	hypoxií indukovaný faktor 1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ )
HR	poměr rizik (hazard ratio)
HRE	hypoxia responsive element
chRCC	chromofóbní renální karcinom (chromophobe renal cell carcinoma)
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor 1 (insuline like growth factor 1)
IGF-1R	receptor IGF-1 (insuline like growth factor 1 receptor)
IGFBP(s)	vazebné proteiny na IGF [insuline like growth factor binding protein(s)]
IMDC	International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium
ISUP	International Society of Urological Pathology
KIM-1	kidney-injury molecule-1
LDH	laktát dehydrogenáza
lccRCC	lokalizovaný světlobuněčný renální karcinom bez relapsu
mccRCC	metastatický světlobuněčný renální karcinom
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MSKCC	Memorian Sloan Kettering Cancer Centre
mTOR	mammalian target of rapamycin

NLR	poměr neutrofilů a lymfocytů (neutrophil-to-lymphocyte ratio)
NSE	neuron specifická enoláza (neuron-specific enolase)
OS	celkové přežití (over-all survival)
PI3K	fosfatidylinositol-3kináza (phosphatidylinositol 3-kinase)
PAPP-A	s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A (pregnancy-associated plasma protein A)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDGF	růstový faktor odvozený z destiček (platelet derived growth factor)
PFS	přežití bez progresu (progression free survival)
PlGF	placentární růstový faktor (placental growth factor)
pRCC	papilární renální karcinom (papillary renal cell carcinoma)
pIRCC	papilární renální karcinom typ I
pIIIRCC	papilární renální karcinom typ II
PS	performance status
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RCC	renální karcinom (renal cell carcinoma)
rccRCC	lokalizovaný světlobuněčný renální karcinom s následným relapsem
RFS	přežití bez recidivy (recurrence free survival)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
ROC	receiver operating characteristics
SD	standardní odchylka (standard deviation)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
TPA/S	tkáňový polypeptidový/specifický antigen (tissue polypeptidic/specific antigen)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TRACE	time resolved amplified cryptate emission
UISS	University of California Integrated Staging System
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR	receptor VEGF (vascular endothelial growth factor receptor)
VHL	von Hippel-Lindau

## OBSAH

1. ÚVOD .....	11
1.1. Renální karcinom .....	11
1.2. Epidemiologie a etiologie .....	12
1.3. Histologické varianty .....	13
1.3.1. Světlobuněčný renální karcinom .....	13
1.3.2. Papilární renální karcinom .....	13
1.3.3. Chromofóbní renální karcinom .....	14
1.3.4. Další histologické varianty .....	15
1.4. Staging nádoru .....	16
1.5. Diagnostika .....	18
1.6. Prognostické faktory .....	18
1.6.1. Anatomické prognostické faktory – staging onemocnění .....	18
1.6.2. Histologické prognostické faktory .....	19
1.6.2.1. Jaderný grade .....	19
1.6.2.2. Histologický subtyp RCC .....	20
1.6.2.3. Sarkomatoidní a rhabdoidní změny .....	22
1.6.2.4. Intratumorální nekróza .....	22
1.6.2.5. Lymfovaskulární invaze .....	23
1.6.2.6. Chirurgické okraje .....	24
1.6.3. Klinické prognostické faktory a běžné laboratorní parametry .....	24
1.6.4. Molekulární faktory – potenciální biomarkery .....	27
1.6.4.1. Von Hippel-Lindau .....	28
1.6.4.2. HIF .....	29
1.6.4.3. VEGF .....	30



1.6.4.4. Karboanhydráza IX .....	31
1.6.4.5. mTOR signální dráha .....	32
1.6.4.6. Další potenciální biomarkery .....	34
1.6.5. Prognostické modely RCC .....	36
1.6.5.1. Prognostické modely lokalizovaného onemocnění .....	37
1.6.5.2. Prognostické modely metastatického onemocnění .....	39
1.7. S těhotenstvím asociované proteiny ve vztahu k RCC .....	41
1.7.1. S těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A (PAPP-A) .....	41
1.7.1.1. Polymorfismus genu <i>PAPP-A</i> .....	42
1.7.2. Placentární růstový faktor (PIGF) .....	43
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE .....	45
2.1. Význam sérových koncentrací PAPP-A v diagnostice	
a stanovení prognózy u pacientů s ccRCC .....	45
2.2. Genetická analýza polymorfismů genu <i>PAPP-A</i> u nemocných s RCC	
a onkocytomem .....	46
2.3. Význam sérových koncentrací PIGF v diagnostice	
a stanovení prognózy u pacientů s ccRCC .....	47
3. METODIKA .....	48
3.1. Metodika experimentální práce I .....	48
3.2. Metodika experimentální práce II .....	50
3.3. Metodika experimentální práce III .....	52
3.4. Statistická analýza .....	54
4. VÝSLEDKY .....	56
4.1. Výsledky experimentální práce I .....	56
4.2. Výsledky experimentální práce II .....	58

4.3. Výsledky experimentální práce III .....	61
5. DISKUSE .....	66
5.1. Diskuse experimentální práce I .....	66
5.2. Diskuse experimentální práce II .....	68
5.3. Diskuse experimentální práce III .....	70
6. ZÁVĚR .....	73
7. SOUHRN/SUMMARY .....	75
7.1. Souhrn .....	75
7.2. Summary .....	76
8. POUŽITÁ LITERATURA .....	77
9. PUBLIKAČNÍ AKTIVITA DOKTORANDA .....	99
9.1. Publikační aktivita doktoranda, která je podkladem disertace .....	99
9.2. Publikační aktivita doktoranda bez přímého vztahu k tématu disertace .....	99
10. PŘÍLOHY .....	102

# 1. ÚVOD

## 1.1. Renální karcinom

Renální karcinom (RCC) je nejčastější malignitou horních cest močových a představuje téměř 3 % všech solidních nádorových onemocnění v dospělosti (Capitiano U. et al., 2018; Siegel RL. et al., 2020). Incidence RCC v České republice se dlouhodobě z dosud neobjasněných příčin řadí k nejvyšším ve světě (Dušek L. et al., data aktuální k roku 2018).

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 současné době je RCC asi v 65 % všech případů zachycen jako náhodný nález na zobrazovacích vyšetřeních provedených pro jiné obtíže pacienta (Siegel RL. et al., 2020). Ovšem i přes narůstající podíl drobných, incidentálních tumorů, bývá RCC až u jedné třetiny nemocných diagnostikován jako pokročilé onemocnění (Ljungberg B. et al., 2022). Metastázy bývají přítomny v době diagnózy u více než 15 % nemocných (Siegel RL. et al., 2020).

V léčbě lokalizovaného RCC je zcela zásadní časné stanovení diagnózy a kompletní chirurgické odstranění tumoru. Úplné chirurgické odstranění (případně radiofrekvenční ablace) 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 (Ljungberg B. et al., 2022). 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 představovat kurativní léčbu. Chemoterapie, radioterapie ani hormonální léčba nejsou u RCC účinné. Základem systémové léčby nemocných s metastatickým světlobuněčným RCC (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 nemocných, u části nemocných k významně dlouhodobé remisi onemocnění, bohužel ale i nadále nejsou u non-respondérů dostačující (Ljungberg B. et al., 2022).

Včasné stanovení diagnózy a přesnější predikce individuálního průběhu onemocnění s identifikací nemocných s vysokých 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. V současnosti je k dispozici řada multivariantních prognostických modelů a nomogramů, které poskytují lepší predikci průběhu onemocnění než samotné anatomické a histologické prognostické faktory. Základem těchto modelů je staging onemocnění a histologické charakteristiky tumoru (především hodnocení jaderného gradu, 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 k dalšímu zpřesnění těchto prognostických modelů. Ovšem i přes intenzivní výzkumné snahy v této oblasti doposud nebyl identifikován žádný vhodný biomarker použitelný pro časnou diagnostiku RCC či predikci průběhu tohoto onemocnění. Studium možných biomarkerů, ať již tkáňových či cirkulujících, má tedy zásadní význam. Současně může přispět k porozumění procesu kancerogeneze RCC a identifikovat molekuly či struktury vhodné pro cílenou léčbu.

## **1.2. Epidemiologie a etiologie**

Nejvyšší výskyt RCC dlouhodobě pozorujeme v západních zemích s meziročním nárůstem o 2 % v posledních dvou dekadách (Capitania U. et al., 2018; Ljungberg B. et al., 2022;). V České republice RCC představuje poměrně časté nádorové onemocnění. V roce 2018 incidence RCC v České republice dosahovala 29/100 000 obyvatel, kdy bylo v tomto roce nově diagnostikováno více než 3 000 případů (Dušek L. et al., data aktuální k roku 2018). RCC postihuje častěji muže (v poměru 1,5:1) s vyšší výskytem ve starší populaci (Capitania U. et al., 2018).

Za hlavní rizikové faktory vzniku RCC je považováno kouření, obezita a hypertenze. Zvýšené riziko RCC rovněž představuje tato diagnóza u příbuzného prvního stupně. Dále byla popsána řada dalších faktorů s možným příznivým či negativním vlivem na vznik RCC, zejména pak dietních vlivů či expozice specifickým kancerogenům, ovšem výsledky nejsou zcela průkazné. Vyvarovat se kouření a redukce obezity je považováno za účinnou profylaxi vzniku RCC (Tahbaz R. et al., 2018).

### 1.3. Histologické varianty

RCC vychází z kůry ledvin a představuje přibližně 90 % primárních renálních tumorů. Histologicky se jedná o značně heterogenní skupinu tumorů, které popisuje klasifikace World Health Organization (WHO) 2016 (Moch H. et al., 2016). Každým rokem jsou nad rámec stávající klasifikace WHO definovány nové histopatologické jednotky RCC nejen na základě jejich morfologie a imunohistochemických vlastností, ale stále častěji na podkladu molekulárně genetických změn (Hes O. et al., 2020).

Převládajícím histologickým typem je světlobuněčný RCC (ccRCC), který prokazujeme až v 80 % případů. Méně časté histologické varianty představují papilární karcinom (pRCC) (12 % případů), chromofóbní karcinom (chRCC) (5 % případů) a další vzácnější subtypy (Moch H. et al., 2016; Ljungberg B. et al., 2022).

#### 1.3.1. Světlobuněčný renální karcinom

Nejčastější histologickou variantu RCC je světlobuněčný RCC, který vychází z buněk proximálního tubulu. Většinou se jedná o dobře ohraničený tumor, který mívá na řezu barvu od šedé až po různé odstíny okrové a zlaté podle obsahu lipidů v buňkách. Často bývá prokrváčený s přítomností nekrózy. Typické cytogenetické změny zahrnují ztrátu krátkého raménka chromozomu 3 (3p), nebo mutaci či inaktivaci *von Hippel-Lindauova* (VHL) tumor supresorového genu na chromozomu 3p25 (Maher ER., 2018). Ztráta tumor supresorového proteinu VHL přispívá k iniciaci karcinogeneze, progresi tumoru a metastazování. Většinou ccRCC představuje sporadický tumor, bilaterální výskyt bývá spojený s VHL chorobou. Nemoc VHL je vzácný autozomálně dominantně dědičný multisystémový neoplastický syndrom, kdy dochází k tvorbě tumorů v mnoha orgánech těla, včetně ledvin. Karcinom ledviny se vyvine až u 35-50 % postižených touto chorobou, často v nižším věku, než je pro ccRCC typické, mnohdy bilaterálně či multifokálně (Maher ER., 2018).

#### 1.3.2. Papilární renální karcinom

Druhým nejčastějším typem je papilární RCC, který vychází z buněk distálního tubulu. Klasifikace WHO rozlišuje dva podtypy – pRCC typ I a II – s odlišnými klinickými i biologickými vlastnostmi.

Typ I pRCC je spojen s aktivační mutací v protoonkogenu *MET*. Pro tento typ je charakteristická přítomnost pevného pseudopouzdra, která zajišťuje jeho pravidelný kulatý vzhled (Pascalovo pravidlo). Při zobrazovacích vyšetřeních proto může imitovat komplikovanou cystu. Makroskopicky je tumor na řezu okrový s vzhledem mletého masa a je velmi fragilní. Mezi typické znaky pRCC typu I se řadí exofytický, extrarenální, růst, nízký jaderný grade i maligní potenciál. Cytogeneticky jsou pro typ I charakteristické změny na chromozomech 7, 17 a ztráta chromozomu Y. Většina nádorů tohoto typu se vyskytuje sporadicky, ale existují i hereditární bilaterální a multifokální nádory spojené s autozomálně dominantní mutací protoonkogenu *MET* na 7q31.3. Typ I je častější a vykazuje lepší prognózu v porovnání s typem II (Warren AY., Harrison D., 2018; Ljungberg B. et al., 2022).

Morfologicky mají buňky pRCC typu II hojnější eosinofilní cytoplazmu a vykazují vyšší jaderný grade. Na molekulární úrovni je tento subtyp spojený s aktivací NRF-2ARE signalizační dráhy. Jedná se o heterogenní skupinu tumorů, s minimálně třemi subtypy s rozdílnou prognózou (Moch H. et al., 2016; Ljungberg B. et al., 2022).

### **1.3.3. Chromofóbní renální karcinom**

Tento typ RCC se v naprosté většině případů vyskytuje sporadicky. Makroskopicky se jedná o tuhý, dobře ohraničený tumor, bez pseudopouzdra, béžové až hnědé barvy. Pro velkou jadernou atypii nelze k hodnocení jaderného gradu užít klasifikaci dle Fuhrmanové, ani aktuálně doporučovanou klasifikaci WHO/ISUP (viz dále). Recentně byl k hodnocení navržen nový gradingový systém vycházející z hodnocení přítomnosti nekrózy a/nebo sarkomatoidních změn, který rozděluje chRCC na low- a high-grade varianty (Ljungberg B. et al., 2022). Typické cytogenetické změny zahrnují ztrátu chromozomu Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 a 21 (Moch H. et al., 2016; Ljungberg B. et al., 2022).

Tumor má nízký metastatický potenciál, ovšem výjimečně může metastazovat i řadu let po chirurgickém výkonu. Prognóza chRCC je relativně dobrá, s vysokým 5letým přežitím bez recidivy (recurrence free survival, RFS) i 10letým nádorově specifickým přežitím (cancer specific survival, CSS) - 89 %, respektive 93 % (Volpe A. et al., 2012).

#### 1.3.4. Další histologické varianty

Další, méně časté, histologické varianty RCC představují širokou heterogenní skupinu vzácných tumorů, sporadických či s familiárním výskytem a neklasifikované varianty RCC. V následujícím textu jsou zmíněny pouze vybrané histologické typy tumorů.

**Renální medulární karcinom.** Tento velmi vzácný typ RCC, postihuje především mladé muže se srpkovitou anémií, v České republice se s ním tedy prakticky nesetkáme. Celosvětově představuje méně než 0,5 % všech případů RCC. Tento typ nádoru je vysoce agresivní a ve většině případů bývá zjištěn až jako metastatické onemocnění. Prognóza nemocných je extrémně špatná, pacienti většinou umírají v průběhu několika měsíců od stanovení diagnózy (Ljungberg B. et al., 2022).

**Karcinom ze sběracích kanálků.** S touto vzácnou histologickou variantou se setkáváme v méně než 1 % všech případů RCC, většinou u mužů středního a vyššího věku. Jedná se o velmi agresivní tumor se špatnou prognózou. V době diagnózy bývá uzlinové postižení zjištěno až u 40 % nemocných a metastázy bývají přítomny u více než třetiny pacientů (Ljungberg B. et al., 2022).

**Karcinom spojený s translokací Xp11.2.** S karcinomem spojeným s translokací Xp11.2. a fúzí *TFE3* genu (transkripční faktor E3) se setkáváme zejména u mladých dospělých a dětí. Jedná se o heterogenní skupinu tumorů s odlišnými klinickými, patologickými a molekulárními charakteristikami. Prognóza tohoto typu nádoru zůstává vzhledem k nízkému výskytu nejasná, v dospělosti se však jedná o agresivní nádor se špatnou prognózou (Ljungberg B. et al., 2022).

**Familiární renální karcinom.** Ledvina bývá postižena karcinomy u řady geneticky podmíněných syndromů. S tumory se často setkáváme v nižším věku než při sporadickém výskytu, častěji bývají multifokální a bilaterální. Výskyt ccRCC při VHL syndromu byl zmíněn již výše. Z dalších neoplázií se u tohoto syndromu setkáváme s angiofibromy a hemangioblastomy v sítnici a CNS, fechromocytomem a neuroendokrinními nádory. V případě autozomálně dominantně dědičného syndromu Brit-Hogg-Dublé vznikají v ledvinách nejružnější varianty RCC, nejčastěji chRCC, případně pRCC. Současně je pro tento syndrom charakteristický vznik plicních cyst s rizikem spontánního pneumothoraxu. Hereditární leiomyomatóza představuje vzácné autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které predisponuje ke vzniku mnohočetných kožních a děložních leiomyomů a RCC, zejména pak pRCC typu II (Kolář J. et al., 2020).

#### **1.4. Staging nádoru**

K popisu rozsahu nádoru a určení stadia onemocnění se v klinické praxi i pro vědecké účely rutinně používá klasifikace TNM (TNM Classification of Malignant Tumours). Aktuálně je používána verze TNM8 z roku 2017 (Brierley JD. et al., 2017). Klasifikace TNM zohledňuje v kategorii T (Tumor) velikost a lokální rozsah primárního nádoru včetně jeho šíření do žilního systému, v kategorii N (Nodes) uzlinové postižení a v kategorii M (Metastasis) přítomnost metastáz (Tab. 1.)



**Tab. 1. TNM klasifikace renálního karcinomu z roku 2017**

<b>T – Primární nádor</b>		
<b>TX</b>		Primární nádor nelze hodnotit
<b>T0</b>		Bez známek primárního nádoru
<b>T1</b>		Nádor do 7 cm v největším rozměru, omezen na ledvinu
	<b>T1a</b>	Nádor do 4 cm
	<b>T1b</b>	Nádor větší než 4 cm, ne však více než 7 cm
<b>T2</b>		Nádor větší než 7 cm v největším rozměru, omezen na ledvinu
	<b>T2a</b>	Nádor větší než 7 cm, ne však více než 10 cm
	<b>T2b</b>	Nádor větší než 10 cm, omezen na ledvinu
<b>T3</b>		Nádor se šíří do velkých žil nebo do perirenálních tkání, ne však do stejnostranné nadledviny, ne přes Gerotovu fascii
	<b>T3a</b>	Nádor se šíří do v. renalis včetně jejích subsegmentálních větví, nebo nádor postihuje kalichopánvičkový systém, perirenální tuk a/nebo tuk renálního sinu (peripelvičkový), nepřesahuje však Gerotovu fascii
	<b>T3b</b>	Nádor se šíří do duté žíly pod bránicí
	<b>T3c</b>	Nádor se šíří do duté žíly nad bránicí nebo postihuje stěnu duté žíly
<b>T4</b>		Nádor se šíří přes Gerotovu fascii (včetně souvislého šíření do stejnostranné nadledviny)
<b>N – Regionální mízní uzliny</b>		
<b>NX</b>		Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
<b>N0</b>		Regionální mízní uzliny jsou bez metastáz
<b>N1</b>		Metastáza v jedné regionální mízní uzlině (uzlinách)
<b>M – Vzdálené metastázy</b>		
<b>MX</b>		Vzdálené metastázy nelze hodnotit
<b>M0</b>		Bez vzdálených metastáz
<b>M1</b>		Vzdálené metastázy
<b>pTNM klinická stádia</b>		
<b>I</b>		T1 N0 M0
<b>II</b>		T2 N0 M0
<b>III</b>		T3 N0 M0
		T1, T2, T3 N1 M0
<b>IV</b>		T4 jakékoli N M0
		jakékoli T jakékoli N M1

Upraveno dle Brierley JD. et al., 2017; Český překlad TNM klasifikace dostupný na:

<https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=4577>.

## 1.5. Diagnostika

Mnoho renálních tumorů zůstává asymptomatických až do pozdních stádií, což znesnadňuje diagnostiku toho onemocnění. V současné době bývá RCC ve více než polovině případů zachycen jako náhodný nález při neinvazivních zobrazovacích vyšetřeních provedených pro nespecifické příznaky či jiná břišní onemocnění (Ljungberg B. et al., 2022). S klasickou diagnostickou triádou – bolesti v bedru, hematurie, hmatná renální masa – se dnes setkáváme jen poměrně zřídka (přibližně v 6-10 % všech případů). Tato triáda bývá spojena s lokálně pokročilým onemocněním, agresivním chováním tumoru a horší prognózou. Většina pokročilých tumorů se však projevuje spíše nespecifickými celkovými příznaky přítomnosti nádoru (jako jsou nechutenství, hubnutí, anemie a další) a symptomy z metastatického rozsevu (dušnost, kašel, kostní bolesti, patologické zlomeniny a další). Vzhledem k produkci nejrůznějších působků jsou u RCC časté paraneoplastické příznaky, které bývají vyjádřeny u 10-40 % nemocných. Horečka, anemie, nechutenství a ztráta hmotnosti bývají prvotními příznaky přítomnosti RCC až u jedné třetiny pacientů. Mezi další možné paraneoplastické příznaky se řadí například hyperkalcémie, hypertenze, leukocytóza či Staufferův syndrom (paraneoplastická hepatopatie) (Sacco E. et al., 2009; Ljungberg B. et al., 2022).

## 1.6. Prognostické faktory

I přes pokroky v diagnostice a léčbě se RCC řadí mezi nej malignější urologická onemocnění, navíc s obtížně predikovatelným průběhem. Do současnosti byla identifikována řada faktorů, které napomáhají zpřesnit odhad individuálního průběhu onemocnění. Prognostické faktory lze rozdělit na anatomické, histologické, klinické a molekulární. Nejvyšší prognostický význam vykazují faktory anatomické a histologické.

Prognostickými faktory RCC jsem se zabývala v přehledovém článku (Čechová et al., *in press*). Tuto problematiku nemohu opomenout ani zde, v následujícím textu se detailněji zaměřím na laboratorní parametry a molekulární markery.

### 1.6.1. Anatomické prognostické faktory – staging onemocnění

Staging onemocnění má zcela zásadní prognostický význam. K určení stagingu slouží klasifikace TNM, která zohledňuje anatomické faktory, a to v kategorii T velikost a rozsah primárního tumoru (šíření do žilního systému, do kalichopánvičkového systému, do

perirenálního a/nebo peripelvického tuku či nadledviny), dále v kategorii N uzlinové postižení a v kategorii M přítomnost vzdálených metastáz. Klasifikace TNM je pravidelně revidována, tak aby její prognostický přínos byl co nejvyšší. Aktuálně se používá verze TNM8 z roku 2017 (Brierley JD. et al., 2017) (viz Tab. 1).

## **1.6.2. Histologické prognostické faktory**

Mezi histologické prognostické faktory řadíme jaderný grade (grading malignity), subtyp RCC, přítomnost sarkomatoidních či rhabdoidních morfologických změn, lymfovaskulární invazi, výskyt intratumorální nekrózy a průkaz invaze do sběracích kanálků. Mezi histologické prognostické faktory lze uvést i stav chirurgických okrajů, který má zásadní význam zejména u resekčních výkonů a ukazuje na kompletnost operačního výkonu.

### **1.6.2.1. Jaderný grade**

Jedním z nejdůležitějších histologických faktorů ovlivňujících prognózu nemocných s RCC je jaderný grade (grading malignity).

V roce 1982 byla představena čtyřstupňová klasifikace jaderného gradu dle Fuhrmanové zohledňující současně charakteristiky jádra a jadérka (velikost a tvar jádra, prominence jadérka). Klasifikace jaderného gradu dle Fuhrmanové byla mezinárodně akceptována a po desetiletí užívána. Ovšem její použitelnost v praxi není optimální pro výraznou proměnlivost výsledků mezi jednotlivými hodnotiteli při důsledném užívání všech čtyř stupňů této klasifikace. Z tohoto důvodu byl v návaznosti na závěry mezinárodního kongresu International Society of Urological Pathology (ISUP) ve Vancouveru v roce 2012 představen nový systém hodnocení jaderného gradingu. Tento systém následně WHO doporučila k užití v klinické praxi. Opět se jedná o čtyř stupňový model. Jaderné změny jsou hodnoceny gradem 1-3, nález vysoce atypických pleomorfních buněk a/nebo sarkomatoidních či rhabdoidních buněčných změn je klasifikován jako grade 4. Jaderný grade je určen přítomností buněk s nejvyšší jadernou atypií, nikoli převládající morfologií. V praxi je tak tato nová klasifikace WHO/ISUP snáze aplikovatelná a reprodukovatelná (Delahunt B. et al., 2013). V porovnání s klasifikací dle Fuhrmanové navíc poskytuje vyšší prognostickou hodnotu zejména u tumorů grade 2 a 3 (Dagher J. et al., 2017).

Klasifikaci WHO/ISUP lze aplikovat na ccRCC a pRCC. Její použití u chRCC není aktuálně doporučeno (Ljungberg B. et al., 2022). Přesto, že k hodnocení jaderného gradu u chRCC byla představena řada systémů, dosud žádný nebyl mezinárodně přijat k užití v klinické praxi. Recentní multicentrická studie navrhuje k hodnocení gradingu u chRCC užití dvoustupňové klasifikace (low- a high-grade) podle průkazu přítomnosti sarkomatoidních změn a/nebo nekrózy (Ohashi R. et al., 2020).

Je třeba připomenout skutečnost, že prognostické systémy a modely pracují s hodnocením jaderného gradu dle Fuhrmanové. Užití klasifikace WHO/ISUP nebylo doposud pro tyto systémy validováno.

#### **1.6.2.2. Histologický subtyp RCC**

Histologický typ RCC je považován za důležitý prognostický faktor. Prognostický význam tří nejčastějších histologických variant RCC (ccRCC, chRCC a pRCC) zkoumala rozsáhlá retrospektivní multicentrická studie autorů Patard et al. Zhodnocení histologických nálezů u více než 4 000 pacientů prokázalo lepší prognózu u nemocných s chRCC v univariantské analýze. Ovšem při rozdělení dle stádia onemocnění a jaderného gradu již prognostický význam histologického typu RCC nebyl patrný (Patard JJ. et al., 2005). Recentní retrospektivní multicentrická studie autorů Wagener et al. hodnotící přežití u více než 7 000 pacientů operovaných pro lokalizovaný pRCC a ccRCC potvrdila lepší přežití u nemocných s pRCC typu I v porovnání s ccRCC (Wagener N. et al., 2017). Jak je již zmíněno v předchozím textu, klasifikace WHO rozlišuje dva podtypy pRCC – typ I a typ II. Častější typ I vykazuje lepší prognózu v porovnání s typem II (Moch H. et al., 2016; Ljungberg B. et al., 2022). Nejhorší prognózu typicky mívají nádory vycházející ze sběracích kanálků a dediferencované neklasifikovatelné typy. Raritní varianta RCC s Xp11.2 translokací je rovněž spojena s velmi špatnou prognózou (Ljungberg B. et al., 2022).

Rozdíly ve stagingu, gradingu a CSS u tří nejčastějších histologických typů shrnuje tabulka 2. (Tab. 2.) (Leibovich BC. et al., 2010; Ljungberg B. et al., 2022). U ccRCC se v porovnání s chRCC a pRCC častěji jedná již v době diagnózy o pokročilé onemocnění, což koreluje s horší prognózou (Ljungberg B. et al., 2022).

**Tab. 2. Základní charakteristiky tří nejčastějších histologických subtypů RCC a CSS**

Subtyp RCC	% RCC	Pokročilé onemocnění v době diagnózy (T3-4, N+, M+)	Grade 3-4 (dle Fuhrmanové)	10leté CSS
Světlobuněčný RCC	80–90 %	28 %	28,5 %	62 %
Papilární RCC	6–15 %	17,6 %	28,8 %	86 %
Chromofóbní RCC	2–5 %	16,9 %	32,7 %	86 %

Převzato a upraveno dle EAU Guidelines (Ljungberg B. et al., 2022)

RCC: renální karcinom; CSS: nádorově specifické přežití.

Prognóza se u všech histologických typů RCC zhoršuje s narůstajícím stagem a jaderným gradem, což ilustruje tabulka 3. (Tab. 3.) (Keegan KA. et al., 2012; Ljungberg B. et al., 2022). Zdá se, že počet postižených lymfatických uzlin je důležitým prediktorem přežití u nemocných bez průkazu vzdálených metastáz, avšak toto není v aktuálně používané klasifikaci TNM zohledněno (Golijanin B. et al., 2019).

**Tab. 3. Nádorově specifické přežití (CSS) dle stadia onemocnění**

Grade	HR (95 % CI)
T1N0M0	Referenční hodnota
T2N0M0	2,71 (2,17–3,39)
T3N0M0	5,20 (4,36–6,21)
T4N0M0	16,88 (12,40–22,98)
N+M0	16,33 (12,89–20,73)
M+	33,23 (28,18–39,18)

Převzato z EAU Guidelines (Ljungberg B. et al., 2022)

HR: poměr rizik (hazard ratio); CI: interval spolehlivosti.

U RCC činí celkové 5leté přežití (over-all survival, OS) 49 %. Po roce 2006 došlo k mírnému zlepšení OS, což je pravděpodobně dáno vyšším zachytem drobných náhodně zjištěných tumorů a efektivními možnostmi systémové léčby (Ljungberg B. et al., 2022).

### **1.6.2.3. Sarkomatoidní a rhabdoidní změny**

Přítomnost buněk rhabdoidního a sarkomatoidního vzhledu je typickým znakem high-grade nádorů a bývá spojena se špatnou prognózou. Klasifikace WHO/ISUP tyto změny hodnotí jako grade 4. Se špatnou prognózou je spojen zejména průkaz sarkomatoidní morfologie – 5leté přežití u tumorů vykazující tyto rysy je udáváno v rozmezí 15-22 % a v 55-75 % případů jsou již v době diagnózy přítomny vzdálené metastázy. Sarkomatoidní změny mohou vykazovat všechny histologické typy RCC a setkáváme se s nimi přibližně v 5 % všech případů. Prognostický význam má i podíl zastoupení této morfologie, ovšem chybí jednoznačný konsensus ohledně hodnocení a interpretace těchto změn (Warren AY., Harrison D., 2018).

### **1.6.2.4. Intratumorální nekróza**

Nekróza je u RCC častá a setkáváme se s ní až ve třetině všech případů. Publikované vědecké práce naznačují, že přítomnost nekrózy odráží biologické chování tumoru a jeho agresivitu. Prognosticky významná se zdá být pouze přítomnost intratumorální koagulační nekrózy, nikoli nekrózy viditelné makroskopicky, tedy pouhým okem. Patogeneze vzniku koagulační nekrózy není zcela objasněna. Nejčastější hypotézy předpokládají vznik koagulační nekrózy v důsledku vaskulární remodelace při proliferaci tumoru a přerůstání tumoru nad možnosti svého cévního zásobení (Leibovich BC. et al., 2003; Delahunt B. et al., 2013; Warren AY., Harrison D., 2018).

U ccRCC se s koagulační nekrózou setkáváme v 27-32 % případů (Delahunt B. et al., 2013). Průkaz koagulační nekrózy u tohoto histologického typu RCC byl identifikována jako nezávislý rizikový faktor progresu onemocnění a úmrtí vlivem nádoru (Frank I. et al., 2002; Leibovich BC. et al., 2003; Sengupta S. et al., 2005; Zhang L. et al., 2018). U chRCC bývá koagulační nekróza přítomná spíše ojediněle, pouze v 3-14 % všech případů (Delahunt B. et al., 2013). Ovšem i u tohoto typu RCC byl prokázán její prognostický význam (Sengupta S. et al., 2005). Nejčastěji bývá koagulační nekróza zjištěna u pRCC a to až v 42 % všech

případů, ovšem na rozdíl od předchozích variant zde není prognosticky významná (Delahunst B. et al., 2013).

Rozsah nekrózy se zdá být prognosticky významnější než její přítomnost, respektive absence (Klatte T. et al., 2009; Katz MD. et al., 2010). Při histopatologickém vyšetření by měla být hodnocena nejen přítomnost nekrózy, ale i její zastoupení, které je doporučeno uvádět v 5 % přírůstcích. Ovšem na popisu podílu nekrózy v preparátu nepanuje jednoznačný konsensus, ani nebyla stanovena jasná prognosticky významná hranice (Warren AY., Harrison D., 2018).

Přítomnosti nekrózy jakožto prognostického faktoru je součástí vybraných prognostických modelů. Je zohledněna například v modelu SSIGN (Stage, Size, Grade, Necrosis) a v Leibovichových modelech (Frank I. et al., 2002; Leibovich BC. et al., 2003; Leibovich BC. et al., 2018).

Prognostický vliv přítomnosti a podílu zastoupení intratumorální koagulační nekrózy jsme hodnotili i na souboru pacientů operovaných pro ccRCC na Urologické klinice 2. lékařské fakulty UK a FN Motol. Ve shodě s velkými studiemi jsme potvrdili koagulační nekrózu jako rizikový faktor relapsu onemocnění, současně při vyšším podílu nekrózy bylo riziko relapsu signifikantně vyšší (Čechová M. et al., 2022). V tomto textu je o problematice nekrózy a zejména jejím prognostickým významu u ccRCC pojednáno blíže.

#### **1.6.2.5. Lymfovaskulární invaze**

Označením lymfovaskulární invaze rozumíme šíření nádoru do cévního a lymfatického systému, tedy cesty jeho progresu. Makroskopicky patrná invaze je součástí stagingu onemocnění a je ukotvena v klasifikaci TNM. Prognostický význam mikrovaskulární invaze není jednoznačně doložený. Multicentrická studie autorů Kroeger et al. ukazuje na horší prognózu nemocných s prokázanou mikrovaskulární invazí, nezávisle na velikosti, jaderném gradingu a histologickém typu tumoru (Kroeger N. et al., 2012). Horší prognózu onemocnění při průkazu mikrovaskulární invaze potvrdila i metaanalýza čínských autorů Huang et al. (Huang H. et al., 2015).

### **1.6.2.6. Chirurgické okraje**

Pozitivní chirurgické okraje po resekčním výkonu pro RCC bývají při histopatologickém vyšetření preparátu popsány přibližně v 2-8 % všech případů bez rozdílu dle zvoleného operačního přístupu (otevřený výkon, laparoskopie či roboticky asistovaný výkon) (Choi JE. et al., 2015; Porpiglia F. et al., 2016; Ljungberg B. et al., 2022). Nepřekvapivě jsou pozitivní chirurgické okraje častější v případě imperativního záchovného výkonu (solitární ledvina, bilaterální tumor) a tumorů vyššího stagingu a gradingu (Ljungberg B. et al., 2022). Hodnocení stavu chirurgických okrajů by mělo být rutinní součástí histopatologické vyšetření resektátu.

Prítomnost pozitivních okrajů představuje možné riziko pro vznik lokální recidivy. Onkologický dopad pozitivních chirurgických okrajů však zůstává sporný (Bensalah K. et al., 2010; Porpiglia F. et al., 2016). Retrospektivní multicentrická práce autorů Bensalah et al. neprokázala vliv pozitivních okrajů na zkrácení CSS ani vyšší riziko vzniku vzdálených metastáz (Bensalah K. et al., 2010). Vyšší riziko vzniku lokální recidivy, ovšem bez negativního vlivu na CSS shodně potvrdili také iránské autoři v aktuální práci (Radfar MH. et al., 2021). Výsledky dalších publikovaných studií však nejsou v souladu s těmito závěry. Například italské autoři Tellini et al. v recentní unicentrické studii identifikovali přítomnost pozitivních chirurgických okrajů jako nezávislý faktor zkrácení přežití bez progresu (progression free survival, PFS) při vyšším výskytu vzdálených metastáz i lokální recidivy (Tellini R. et al., 2019). V rozsáhlé práci amerických autorů Wood et al. pak byla lokální recidiva po resekci tumoru ledviny popsána při pozitivních okrajích v 16 % případů v porovnání s pouze 3 % u negativních chirurgických okrajů (Wood EL. et al., 2018).

Dle aktuálního doporučení Evropské urologické společnosti (European Association of Urology, EAU) je následná radikální nefrektomie či opakovaná resekce pozitivních okrajů u většiny nemocných nadbytečným výkonem (over-treatment) a jako alternativu navrhuje intenzivnější pooperační sledování (Ljungberg B. et al., 2022).

### **1.6.3. Klinické prognostické faktory a běžné laboratorní parametry**

Mezi klinické faktory s prognostickým vlivem řadíme zejména celkový stav pacienta (performance status), výskyt paraneoplastických a lokálních symptomů a kachexii. Z rutinně dostupných laboratorních parametrů s prognostickým významem u RCC jsou v literatuře nejčastěji uváděny anemie, počet krevních destiček, lymfocytů, neutrofilů, CRP (C-reaktivní



protein), albumin a další odvozené parametry jako například poměr počtu neutrofilů a lymfocytů (neutrophil-to-lymphocyte ratio, NLR) či další běžně dostupné laboratorní hodnoty. Vybrané parametry jsou blíže diskutovány v následujícím textu.

**Performance status.** Performance status (PS) představuje zhodnocení celkového stavu pacienta, jeho tělesné výkonnosti. Je vodítkem k volbě optimální terapie u nemocného s nádorovým onemocněním. K hodnocení PS se používají standardizované škály. V praxi nejčastěji jsou Karnofského skóre (Karnofsky Performance Status) a ECOG skóre (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG). Hodnocení PS dle Karnofského je součástí nejčastěji používaných prognostických multivariantních modelů pro metastatický RCC – modely Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) a International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium (IMDC). Snížení Karnofského PS < 80 % zde představuje jeden z nepříznivých prognostických faktorů (Motzer RJ. et al., 2002; Heng DY. et al., 2013). Hodnocení PS dle ECOG je například jedním z faktorů v systému UISS (University of California Integrated Staging System, UISS), který se užívá k hodnocení prognózy lokalizovaného RCC (Zisman A. et al., 2002).

**Přítomnost symptomů.** Jak již bylo zmíněno v předchozí části práce, tak RCC ve většině případů zůstává asymptotický až do pozdních stádií. Typická diagnostická trias – hematurie, lumbalgie a hmatná masa – je vzácná a bývá spojena s lokálně pokročilým a agresivním onemocněním. Většina pokročilých tumorů se projevuje spíše nespecifickými příznaky přítomnosti nádorového růstu či metastatického rozsevu. Další kategorii možných symptomů představují paraneoplastické příznaky. Přítomnost symptomatického onemocnění byla autory Leibovich et al. identifikována jako jeden z negativních prognostických faktorů pro CSS a DFS (disease free survival, přežití bez recidivy) u nemocných s ccRCC. Výskyt příznaků je jednou z proměnných ovlivňujících prognózu onemocnění v upravené verzi Leibovichova nomogramu z roku 2018 (Leibovich BC. et al., 2018).

**Anemie.** Anemie je prokazatelná až u 20 % nemocných s RCC a bývá jedním z nespecifických příznaků maligního onemocnění. Nejčastěji bývá důsledkem špatného stavu nutričního při chronickém onemocnění, ale u RCC může být způsobena i produkcí feritinu a lactoferrinu v tumoru (Sacco E. et al., 2009). Na korelaci nízké hladiny hemoglobinu s CSS poukázal ve své práci rovněž autorský kolektiv Karakiewicz et al. Ovšem přidání anemie nepřineslo další zpřesnění nomogramu navrženému autory založenému na stagingu, gradingu, histologickém typu RCC a hodnocení PS dle ECOG (Karakiewicz PI. et al., 2007). Při

hodnocení dat vycházejících z velkých multicentrických sad nemocných s metastatickým RCC byla anémie identifikována jako negativní prognostický faktor přežití. Koncentrace hemoglobinu pod dolní hranicí normy je jednou z proměnných nejpoužívanějších prognostických modelů pro metastatický RCC – modelu MSKCC i IMDC (Moetzer JR. et al., 2002; Heng DY et al., 2013). Fyziologická hladina hemoglobinu a hematokritu představuje, na druhou stranu, příznivý faktor pro přežití (Seda CJ. et al., 2011).

**Trombocytóza.** Předpokládá se, že ke zvýšení počtu trombocytů dochází v důsledku nádorové produkce cytokinů, především interleukinu 6, společně se zvýšenou produkcí trombopoetinu, jakožto proteinu akutní fáze, v jaterních buňkách. Potenciálním prognostickým přínosem trombocytózy se zabývala řada vědeckých prací, výsledky však nejsou jednoznačné (Sun M. et al., 2011). Trombocytóza byla identifikována v práci autorů Bensalah et al. jako nezávislý prognostický faktor pro přežití. Současně autoři postulují, že vzhledem k biologické povaze vzniku koreluje trombocytóza s agresivitou tumoru (Bensalah K. et al., 2006). Výsledky autorského kolektivu Karakiewicz et al. rovněž prokázaly korelaci trombocytózy se zkrácením CSS, ovšem její přidání do prognostického modelu nevedlo k jeho dalšímu zpřesnění (Karakiewicz PI. et al., 2007). Multicentrická retrospektivní analýza německých autorů provedená na velkém počtu nemocných s RCC dospěla k obdobným výsledkům – studie potvrdila korelaci trombocytózy se zkrácením CSS u lokalizovaného RCC, ovšem neprokázala její prognostický význam u metastatického RCC. Přidání trombocytózy do multivariantního prognostického modelu však také nevedlo k jeho významnému zpřesnění (Brookman-May S. et al., 2013).

**NLR.** Poměr neutrofilů a lymfocytů je parametrem systémové zánětlivé odpovědi. Prognostickým významem NLR u RCC se zabývala řada studií, závěry však také nejsou zcela přesvědčivé (Sun M. et al., 2011). Rozsáhlá recentní metaanalýza autorského kolektivu Shao et al. prokázala korelaci vysokého předoperačního NLR s horší prognózou onemocnění. Přesná hodnota NLR s předpokládanou prognostickou hodnotou však stanovena nebyla (Shao Y. et al., 2020).

**CRP.** CRP je proteinem akutní fáze a představuje další z markerů systémové zánětlivé odpovědi. Ovšem může být produkován i vlastními nádorovými buňkami (Jabs WJ. et al., 2005). Vztahem sérové koncentrace CRP k prognóze nemocných s RCC se zabývala řada vědeckých prací. Výsledky ukazují, že zvýšení hladiny CRP je spojeno s velkým objemem nádorové masy a přítomností metastáz (Sun M. et al., 2011). Významem CRP se ve své práci zabýval i autorský kolektiv Karakiewicz et al., který identifikoval vysokou předoperační

hladinu CRP v multivariantsní analýze jako nezávislý faktor CSS. Navíc přidání hodnoty CRP do stávajících prognostických nomogramů vedlo ke zlepšení jejich prediktivní hodnoty o 3,7 % (Karakiewicz P. et al., 2007). Výsledky rozsáhlé multicentrické studie německých autorů prokázaly spojitost vyšších předoperačních koncentrací CRP s horším stagingem onemocnění, přítomností uzlinového postižení a výskytem vzdálených metastáz. Hodnota CRP byla rovněž identifikována jako nezávislý prediktor CSS i OS (Steffens S. et al., 2012). Z českých autorů, kteří zkoumali prognostický význam klinických faktorů včetně sérové hladiny CRP ve vztahu k RCC, jmenujme například práci kolegů z Všeobecné fakultní nemocnice, kteří ve svých výsledcích potvrdili korelaci vyšších koncentrací CRP s metastatickým postižením (při hodnotě CRP vyšší než 15 ng/ml bylo riziko generalizace 22krát vyšší) (Sobotka R. et al., 2014).

**Obezita.** Obezita je považována za jeden z rizikových faktorů pro vznik RCC (Tahbaz R. et al., 2018). Ukazuje se však, že má i prognostický význam. Rozsáhlá metaanalýza autorů Choi et al. hodnotící přežití u nemocných po nefrektomii překvapivě identifikovala obezitu jako nezávislý prognostický indikátor lepšího přežití. Vyšší předoperační BMI sledovaných pacientů korelovalo v této studii s lepším OS, CSS i RFS (Choi Y. et al., 2013). Další autoři pak prokázali spojitost obezity s lepším přežitím a prodloužením PFS i u metastatického RCC (Albiges L. et al., 2016). Paradoxní je, že narůstající BMI pozitivně koreluje s CSS, ovšem u obézních nemocných s RCC je vyšší riziko úmrtí z jiné příčiny (snížení OS) (Bagheri M. et al., 2016).

#### **1.6.4. Molekulární faktory – potenciální biomarkery**

V posledních desetiletích probíhá intenzivní studium potenciálních biomarkerů, které by byly přínosné pro diagnostiku či hodnocení prognózy nemocných s RCC. Do současnosti však nebyl identifikován žádný biomarker, který by byl spolehlivě schopen prokázat přítomnost lokalizovaného či metastatického onemocnění RCC. Současně není k dispozici ani vhodný biomarker k hodnocení prognózy tohoto onemocnění – ať již k určení rizika relapsu po kurativní chirurgické léčbě lokalizovaného tumoru či odpovědi na cílenou léčbu u metastatického onemocnění.

Biomarkery můžeme rozdělit na cirkulující a tkáňové. Získání biomarkeru by mělo být co nejsnazší, zatížené co nejmenší invazivitou odběru. Proto se jako ideální jeví biomarkery detekovatelné v moči či krvi (tzv. cirkulující biomarkery). V případě stanovení biomarkeru

z krve je vyšetřovaným vzorkem krevní sérum nebo plazma. Pro stanovení tkáňového biomarkeru je již nutný vzorek tumorózní tkáně. Dostatečné množství tkáně může být zejména u vzorků získaných biopsií ledviny limitní, zvláště vezmeme-li v potaz velkou histologickou heterogenitu RCC.

V literatuře jsou jako potenciální biomarkery RCC nejčastěji zmiňovány karboanhydráza IX (carbonic anhydrase IX, CaIX), VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor, vascular endothelial growth factor), HIF (hypoxií indukovaný faktor, 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 (ribonukleová kyselina, ribonucleic acid) - miRNA, lncRNA a další – představují další novou, potenciálně zajímavou skupinu možných biomarkerů. Souběžně probíhá intenzivní výzkum genové exprese v tumoru (Ljungberg B. et al., 2022).

Dosavadní studium potenciálních biomarkerů přineslo zlepšení porozumění procesu kancerogeneze, a to nejen u RCC, a současně pomohlo identifikovat cílová místa pro systémovou léčbu. Doposud ale nevedlo k identifikaci spolehlivého biomarkeru vhodného pro časnou diagnostiku RCC. Většinu zkoumaných biomarkerů lze použít spíše k predikci prognózy tohoto onemocnění. Přidání některých potenciálních biomarkerů vedlo ke zlepšení přesnosti prognostických modelů, ale validační studie potvrzující opravdovou přínosnost zkoumaných biomarkerů chybí. Rovněž užití žádného biomarkeru doposud nebylo doporučeno pro klinickou praxi (Ljungberg B. et al., 2022).

EAU aktuálně nedoporučuje rutinní použití žádného biomarkeru u RCC v klinické praxi (Ljungberg B. et al., 2022). Česká společnost klinické biochemie navrhuje ve svých doporučených postupech vzhledem k absenci specifických biomarkerů RCC možnost užití alespoň nespecifických nádorových markerů, konkrétně TPA/S (tkáňový polypeptidový/specifický antigen, tissue polypeptidic/specific antigen), CEA (karcinoembryonální antigen, carcinoembryonic antigen) a NSE (neuron specifická enoláza, neuron-specific enolase) (Springer D. et al., 2021).

#### **1.6.4.1. Von Hippel-Lindau**

Ztrátu funkce tumor supresorového genu *VHL*, lokalizovaného na krátkém raménku chromozomu 3 (3p25), lze zjistit u všech familiárních forem RCC, u sporadických tumorů pak asi v 70 % všech případů (Sun M. et al., 2011). Jak již bylo zmíněno v předchozí části

práce, tak VHL syndrom představuje autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které je spojeno s vysokým rizikem vzniku benigních i maligních nádorů, zejména angiofibromů a hemangioblastomů v sítnici a mozečku, dále nádorů pankreatu, fibromů kůže, feochromocytomů a RCC. Zářodková mutace genu *VHL* vede u nosičů mutace tohoto tumor supresorového genu k výskytu RCC v nižším věku (typicky před 40. rokem věku), tumory bývají často bilaterální a multifokální (Maher ER., 2018).

Za normálních podmínek (při normoxémii, tedy při dostatečném zásobení tkání kyslíkem) se VHL protein váže na HIF-1 $\alpha$  (hypoxií indukovaný faktor 1 $\alpha$ , hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ), čímž dochází ke spuštění procesu ubiquitinace vedoucí k degradaci proteinu HIF-1 $\alpha$ . Porucha funkce VHL proteinu (nejčastěji v důsledku mutace či delece genu *VHL*) je spojená s kumulací HIF-1 $\alpha$  i za normálních podmínek (tedy nikoli pouze při hypoxii) což vede k iniciaci transkripce řady genů ovlivňujících angiogenezi, metabolismus a regulujících přežití.

Význam mutace genu *VHL* na prognózu nemocných s RCC byl intenzivně zkoumán, výsledky dosavadního výzkumu však nejsou zcela jednoznačné. Japonští autoři Yao et al. ve své práci prokázali spojitost alterace genu *VHL* s lepším DFS a CSS u nemocných po nefrektomii pro sporadický ccRCC ve stadiu I-III (Yao M. et al., 2002). Výsledky studie švýcarských autorů však signifikantní rozdíl v přežití nemocných s prokázanou mutací genu *VHL* v porovnání se skupinou bez této mutace nepotvrdily. Autoři tak postulovali, že regulace angiogeneze a proliferace není přímo ovlivněná mutací genu *VHL*, ale mutace spojená se ztrátou funkce genu přímo ovlivňuje progresi ccRCC (Schraml P. et al., 2002). Předmětem výzkumu byla i možnost užití genu *VHL* jako tkáňového biomarkeru k predikci odpovědi na cílenou léčbu. Zdá se, že přítomnost mutace genu *VHL* je spojena s lepší odpovědí na léčbu (Rini BI. et al., 2006; Choueiri TK et al., 2008). S vývojem nových typů cílené a systémové léčby však nedošlo k širšímu využití genu *VHL* jako možného prognostického markeru.

#### **1.6.4.2. HIF**

HIF-1 je heterodimerický protein, skládající se ze dvou podjednotek HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$ , který funguje jako transkripční faktor řady genů regulujících angiogenezi, metabolismus glukózy, buněčnou proliferaci, schopnost přežití a metastazování. Při hypoxii, shodně i při porušení funkce genu *VHL*, dochází k nadměrné kumulaci proteinu HIF-1 a jeho následné translokaci do jádra. Zde spouští transkripci hypoxií indukovaných genů, kam řadíme například VEGF,

PDGF (růstový faktor odvozený z destiček, platelet derived growth factor), TGF- $\alpha$  a TGF- $\beta$  (transformující růstový faktor, transforming growth factor) či mTOR kinázy. Nadměrná exprese HIF-1 $\alpha$  byla zjištěna u mnoha typů nádorů. Se zvýšenou expresí HIF-1 $\alpha$  se můžeme setkat až u 75 % všech ccRCC, u dalších histologických subtypů RCC bývá nadměrná exprese prokazatelná pouze asi ve třetině případů (Wiesener MS. et al., 2001). Vyšší koncentrace HIF-1 $\alpha$  koreluje s přítomností mutace *VHL* genu. Prognostický význam zvýšené exprese HIF-1 $\alpha$  byl prokázán pouze u ccRCC (Lidgren A. et al., 2005).

Stejně jako tumorsupresorový gen *VHL* tak i HIF-1 $\alpha$  byl intenzivně zkoumán jako potenciální biomarker RCC. Dosavadní výzkum však nepřinesl jednoznačné výsledky a prognostický význam HIF-1 $\alpha$  u RCC nebyl zcela objasněn a zůstává sporný (Sun M. et al., 2011). Autoři Klatte et al. prokázali vyšší expresi HIF-1 $\alpha$  u ccRCC v porovnání s dalšími histologickými variantami RCC. Především ale zjistili horší prognózu nemocných s metastatickým ccRCC s vyšší expresí HIF-1 $\alpha$  (Klatte T. et al., 2007). K obdobným závěrům dospěli i autoři Fan et al., kteří ve své metaanalýze demonstrovali spojitost vysoké jaderné exprese HIF-1 $\alpha$  se zkrácením OS a vysoké cytoplazmatické exprese HIF-2 $\alpha$  se zkrácením CSS (Fan Y. et al., 2015).

#### **1.6.4.3. VEGF**

Tento cytokin z rodiny destičkových růstových faktorů (PDGF) hraje klíčovou roli v procesu novotvorby cév. Za normálních podmínek k angiogenezi dochází v průběhu embryonálního vývoje, v dospělosti pak při procesu reparace a regenerace tkání. Současně má novotvorba cév zásadní význam v procesu kancerogeneze, kdy zvyšuje vaskularizaci nádorové tkáně a podporuje tak progresi onemocnění včetně vzniku metastáz. U některých tumorů byla zjištěna korelace zvýšené produkce VEGF se špatnou prognózou onemocnění (Sun M. et al., 2011).

U RCC je zvýšená exprese VEGF vyjma hypoxie spojená s i porušením funkce genu *VHL*. Jak již bylo uvedeno, tak HIF-1 $\alpha$  působí jako transkripční faktor pro řadu hypoxií indukovaných genů, a to včetně proangiogenních cytokinů VEGF a PDGF. Zavedení monoklonálních protilátek proti VEGF (bevacizumab) a blokáda VEGF signální kaskády (tyrosinkinázové inhibitory – sunitinib, sorafenib, pazopanib a další) představovaly významný pokrok v léčbě metastatického RCC. Nepřekvapivě byl proto VEGF zkoumán i jako možný diagnostický a prognostický biomarker RCC. Řada studií potvrdila u ccRCC

korelaci vysoké tkáňové exprese VEGF s velikostí tumoru, jaderným gradem, stagingem onemocnění, přítomností intratumorální nekrózy i mikrovaskulární invaze (Sun M. et al., 2011). Současně byla zjištěna spojitost vysoké hladiny VEGF s horší prognózou onemocnění (Jacobsen J. et al., 2004; Rioux-Leclercq N. et al., 2007). I přes slibné charakteristiky VEGF nebyl jeho přínos jako prognostického markeru externě validován.

V další části práce je vztah VEGF a kancerogeneze rozpracován blíže. PlGF, jeden ze zkoumaných s těhotenstvím asociovaných proteinů, představuje homolog tohoto silného aktivátoru angiogeneze.

#### **1.6.4.4. Karboanhydráza IX**

V důsledku intratumorální hypoxie dochází ke zvýšené expresi genů, které usnadňují anaerobní metabolismus a podporují neovaskularizaci nádorové tkáně. CaIX je transmembránový glykoprotein, který se podílí na regulaci metabolismu glukózy i intra- a extra-celulárního pH při hypoxii. Tento protein je kódován stejnojmenným genem a jeho exprese je regulována především na úrovni genové transkripce. Promotor CaIX obsahuje HRE (hypoxia responsive element), kam se váže HIF-1 $\alpha$ , který iniciaci transkripce CaIX zásadně ovlivňuje. Stejně jako HIF-1 $\alpha$  a další hypoxií indukované růstové faktory, tak i CaIX hraje významnou roli v procesu kancerogeneze. Jeho zvýšená exprese byla zjištěna u řady tumorů, a navíc byla prokázána její korelace s agresivním fenotypem tumoru a špatnou prognózou nemocných (Måseide K. et al., 2004; Driessen A. et al., 2006; Hussain SA. et al., 2007).

U RCC bývá zvýšená exprese CaIX detekovatelná ve více než 80 % všech případů. Nejčastěji u ccRCC, kde bývá prokazatelná až v 90 % všech případů (Sun M. et al., 2011). Oproti tomu ve zdravé tkáni ledviny (stejně jako v dalších tkáních a orgánech) je tento protein exprimován pouze v minimální míře. Výhodou CaIX jako potenciálního biomarkeru je skutečnost, že jeho expresi lze detektovat v nádorové tkáni (je použitelný jako tkáňový biomarker) a současně je zjistitelný i v séru (cirkulující biomarker). Není tedy překvapivé, že řada vědeckých prací zkoumala možný přínos CaIX jako potenciálního biomarkeru RCC. Dosavadní výzkum však nepřinesl jednoznačné výsledky (Sun M. et al., 2011). U lokalizovaného, shodně i metastatického RCC byla zjištěna korelace vysoké hladiny CaIX s lepší prognózou onemocnění. Při hodnocení tkáňové exprese CaIX a Ki67 u ccRCC prokázali američtí autoři spojitost nízké hladiny CaIX s horší prognózou onemocnění (Bui

MH. et al., 2004). Ke shodným závěrům dospěl i autorský kolektiv Leibovich et al. z Mayo Clinic. Ve velké retrospektivní analýze pacientů operovaných pro ccRCC zjistili expresi CaIX v 97 % nádorových vzorků. Prokázali rovněž spojitost nízké exprese CaIX s vyšším rizikem úmrtí na RCC, ovšem pouze v univariantsní analýze. Význam CaIX jako nezávislého prognostického faktoru však nepotvrdili (Leibovich BC. et al., 2007). Další ze studií, která dokládá použitelnost CaIX jako možného biomarkeru k hodnocení prognózy pacientů s ccRCC v kombinaci s VEGF je práce japonských autorů Phuoc et al. Autoři popsali horší prognózu u nemocných s nízkou expresí CaIX a vysokou expresí VEGF. V multivariantsní analýze prokázali kombinaci expresí CaIX-VEGF jako nezávislý prognostický faktor CSS (Phuoc NB. et al., 2008).

Autoři Sim et al. ve své práci hodnotili prognostický význam sérových hladin CaIX, osteopontinu a CRP. U všech tří zkoumaných markerů demonstrovali prognostický význam ve vztahu k CSS i OS v univariantsní analýze. Navíc, přidání těchto parametrů do Karakiewiczova a SSIGN modelu vedlo ke zlepšení jejich prediktivní hodnoty. Současně ukázali, že CaIX v kombinaci s osteopontinem může být přínosný v identifikaci nemocných s vysokým rizikem recidivy a progresu, u kterých by mohl být benefit z adjuvantní léčby a/nebo intenzivnějšího sledování (Sim SH. et al., 2012).

V novější práci použili autoři Liu et al. CaIX ligand k detekci cirkulujících nádorových buněk ccRCC. Ukázali na spojitost mezi přítomností cirkulujících nádorových buněk a rizikem progresu onemocnění. Výsledky této studie tak poukazují na korelaci mezi hladinou CaIX, přítomností cirkulujících nádorových buněk, agresivitou tumoru a rizikem recidivy (Liu S. et al., 2016).

#### **1.6.4.5. mTOR signální dráha**

Serin/threoninová kináza mTOR (mammalian target of rapamycin) je proteinkináza ze skupiny fosfatidylinositol-3kináz (PI3K), která hraje významnou roli v regulaci buněčného růstu, proliferace, přežívání buňky a angiogenezi. Název mTOR je odvozen od jejího inhibitoru – rapamycinu. Toto makrolidové antibiotikum, původně izolované z půdy Velikonočního ostrova (Rapa Nui, odtud název rapamycin), vykazuje imunospresivní účinky a protinádorovou aktivitu. Studium mechanismu účinku rapamycinu byla mTOR signální dráha objevena.



PI3K/Akt/mTOR reaguje na aktuální podmínky prostředí, její aktivace je vyvolána řadou signálů zejména pak růstových faktorů (například VEGF), nutrientů, regulátorů buněčného cyklu a proliferace. Stimulace této dráhy spouští expresi genů kódujících růstové faktory, regulátory buněčného cyklu, proteiny důležité pro přežití buňky a angiogenezi (například VEGF, PDGF či TGF). Nadměrná stimulace signální dráhy PI3K/Akt/mTOR pak hraje důležitou roli v procesu kancerogeneze u řady nádorů včetně RCC. Možnosti inhibice této dráhy byly předmětem intenzivního výzkumu a představují důležitý cíl protinádorové léčby. V léčbě metastatického RCC jsou mTOR inhibitory druhým nejčastějším typem užívané cílené léčby.

Je známo více mechanismů, které mohou vyvolávat nadměrnou aktivaci této signální dráhy a spouštět tak proliferaci a nádorovou transformaci – jedná se o amplifikace, mutace či ztrátu funkce klíčových regulátorů této dráhy, zejména tumor supresorového proteinu PTEN.

Prognostickou rolí mTOR jakožto potenciálního biomarkeru se zabývalo pouze málo vědeckých prací a výsledky nejsou přesvědčivé. Oproti tomu řada studií zkoumala jeho upstream a downstream molekuly, a to i v souvislosti s cílenou léčbou (Sun M. et al., 2011).

**PTEN.** Tumorsupresorový gen *PTEN* kóduje stejnojmenný protein, který má inhibiční účinek na PI3K/Akt/mTOR signální dráhu. PTEN defosforyluje inositoltrifosfát čímž dojde k zastavení Akt (proteinkináza B, protein kinase B) signální dráhy. Mutace tohoto tumor supresorového genu jsou u RCC raritní, bývají však spojené se špatnou prognózou nemocných (Brenner W. et al., 2002). Oproti tomu vyšší exprese PTEN koresponduje s lepším přežitím. Z léčby mTOR inhibitory tak profitují zejména nemocní s nízkou expresí PTEN (Pantuck AJ. et al., 2007).

**Ribozomální protein S6.** Tento protein s kinázovou aktivitou je cílovou molekulou mTOR. Fosforylovaný protein S6 dále ovlivňuje translaci mRNA (messengerová RNA). U metastatického ccRCC je nadměrně exprimován, což poukazuje na aktivaci této signální dráhy. Současně byl ribozomální protein S6 identifikován jako nezávislý prediktor přežití (CSS) jak u metastatického, tak lokalizovaného ccRCC (Pantuck AJ. et al., 2007). Prediktivní význam proteinu S6 byl zkoumán i v kontextu cílené léčby mTOR inhibitory, kdy vysoká exprese tohoto proteinu byla identifikována jako prediktivní faktor příznivé odpovědi na léčbu temsirolimem (Cho D. et al., 2007).

**Proteinkináza B (Akt).** Tato serin/threoninová kináza hraje důležitou roli v regulaci mnoha buněčných procesů včetně buněčného růstu, přežití a nádorové transformace. Akt fosforyluje

řadu substrátu v cytoplasmě i jádru, včetně mTOR. U metastatického RCC byla prokázána korelace vysoké exprese Akt v cytoplasmě s horší prognózou onemocnění, oproti tomu vysoká produkce nukleární Akt byla u lokalizovaného RCC ukazatelem lepšího přežití. K určení prognostického významu a výsledného vlivu na chování nádoru se tedy zdá být relevantní lokalizace této proteinkinázy (Pantuck AJ. et al., 2007). Studie také naznačují, že vysoká tkáňová exprese Akt je prediktorem příznivé odpovědi na cílenou léčbu mTOR inhibitory (Cho D. et al., 2007).

#### 1.6.4.6. Další potenciální biomarkery

Jako potenciální biomarkery, ať již tkáňové či cirkulující, bylo zkoumáno velké množství nejrůznějších molekul. V následujícím textu je uveden přehled dalších, v literatuře nejčastěji zmiňovaných.

**Survivin.** Jedná se o protein zabraňující aktivaci kaspáz, čímž inhibuje proces programované buněčné smrti, apoptózy. K jeho zvýšené expresi dochází v průběhu embryonálního a fetálního vývoje, oproti tomu v normálních diferencovaných tkáních dospělých jedinců je prakticky nedetekovatelný. Zdá se, že zvýšená exprese survivinu hraje zásadní roli v procesu kancerogeneze a byla zjištěna u řady nádorů včetně RCC (Mahotka C. et al., 2002). Detekovatelný bývá u všech subtypů RCC. Výsledky dosavadního výzkumu ukazují, že vysoká exprese survivinu koreluje s nižší diferenciací a agresivnějším chováním tumoru (Parker AS. et al., 2006; Zamparese R. et al., 2008). U lokalizovaného ccRCC byla vysoká exprese survivinu navíc identifikována jako nezávislý prediktor progresse onemocnění (Parker AS. et al., 2006).

**P53.** Tento transkripční faktor je produktem tumor supresorového genu *p53*, má rozhodující roli v regulaci buněčného cyklu a proliferace. Při rozpoznání poškození DNA zastavuje buněčný cyklus ve fázi G1 a buňka tak získá čas k opravě genomu. Pokud oprava neproběhne úspěšně je indukována apoptóza. Koncentrace p53 v buňce je udržována trvale velmi nízká, což zajišťuje MDM2 ligáza, která spouští proces odbourávání p53. Ztráta funkce p53 je spojena se zvýšeným rizikem kancerogeneze. Mutace p53 bývá detekovatelná téměř u poloviny všech nádorů (Hollstein M. et al., 1994). O prognostickém významu p53 u RCC je známo pouze velmi málo. U RCC není pozitivita p53 častá, detekovatelná bývá spíše u metastáz než u primárního nádoru (Zigeuner R. et al., 2004). Zdá se, že exprese p53 je zejména u ccRCC spojena s progresí onemocnění a horší prognózou. Ovšem pozitivita p53

a korelace s prognózou není podložena studii sledující typ mutace genu *p53* (Noon AP. et al., 2010).

**Ki-67.** Rovněž u tohoto markeru buněčné proliferace byl zjištěn vztah s RCC. Vysoká exprese Ki-67 koreluje s agresivním fenotypem ccRCC, horší prognózou a vyšším rizikem rekurence onemocnění (Bui MH. et al., 2004; Klatte T. et al., 2009).

**Osteopontin, stanniocalcin-1.** Dle dostupných zjištění lze předpokládat, že se na procesu kancerogeneze u RCC podílí i dysregulace kalcium fosfátového metabolismu. Osteopontin je proteinem extracelulární matrix a jeho zvýšená exprese byla prokázána u řady malignit. Práce britských autorů Sim et al., která poukazuje na korelaci osteopontinu s horší prognózou ccRCC již byla v textu zmíněna (Sim SH. et al., 2012). Prognostickým významem osteopontinu společně se stanniocalcinem-1 se zabývali i kolegové z Všeobecné fakultní nemocnice. Zjistili vyšší koncentrace těchto markerů u nemocných s RCC v porovnání s kontrolami, současně pozorovali vyšší koncentraci stanniocalcinu-1 u nemocných s metastatickým onemocněním v porovnání s nemocnými s lokalizovaným RCC. Dále prokázali negativní prognostický význam vysokých hladin osteopontinu a stanniocalcinu-1 ve vztahu k OS a CSS a konečně zjistili vyšší riziko relapsu u nemocných s vysokými předoperačními koncentracemi stanniocalcinu-1 (Sobotka R. et al., 2018).

**Kidney-Injury Molecule-1 (KIM-1).** KIM-1 je membránový glykoprotein, který je za normálních podmínek v ledvině a dalších tkáních produkován pouze v minimálním množství. Hojně je však exprimován při porušení proximálních renálních tubulů, kdy je detekovatelný v krvi a moči. Imunohistochemicky lze prokázat zvýšenou expresi KIM-1 v naprosté většině případů ccRCC (v 74-91 %) a pRCC (až v 93 %), které vychází k proximálních tubulů, oproti tomu u chRCC a onkocytomů je exprimován pouze raritně (Han WK. et al., 2005, Lin F. et al., 2007; Zhang KJ. et al., 2019). KIM-1 se jeví jako slibný potenciální biomarker pro časnou diagnostiku RCC. Ve své práci autoři Scelo et al. popsali zvýšení koncentrace KIM-1 v séru zjistitelnou až 5 let před stanovením diagnózy RCC. Současně prokázali korelaci vysokých sérových koncentrací KIM-1 s kratším přežitím (Scelo G. et al., 2018). Přesto, že tyto výsledky vypadají velmi slibně, k ozřejmění role KIM-1 jako možného biomarkeru u RCC jsou nezbytné další studie a externí validace výsledků na velkém souboru nemocných.

**BAP1, PBRM1.** *BAP1* a *PBRM1* se řadí mezi tumor supresorové geny. Tyto geny jsou lokalizovány na krátkém raménku chromozomu 3 (3p). V tomto místě je delece zjistitelná

až u 90 % všech ccRCC. Výsledky dosavadního výzkumu ukazují, že ztráta těchto tumor supresorových genů koreluje s vyšším rizikem recidivy a horší prognózou onemocnění (Kapur P. et al., 2013; Minardi D. et al., 2016; Joseph RW. et al., 2016). Zdá se, že pacienti s tumory s mutací genu *BAP1* mají horší prognózu než ti s mutací genu *PBRM1* (Kapur P. et al., 2013).

**Další genové a chromozomální změny u RCC.** U nemocných s RCC s prokazatelnou delecí ramének chromozomů 9p a 14q bylo opakovaně potvrzeno horší přežití (Ljungberg B. et al., 2022). Do popředí vědeckého zájmu se recentně dostává multigenová analýza tumorů. Konsorcium TRACERx (Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases) zabývající se výzkumem ccRCC navrhlo genetickou klasifikaci RCC na podkladě genových mutací, která koreluje s agresivitou tumoru a prognózou onemocnění (Turajlic S. et al., 2018). Další zajímavou prací zkoumající prognostický vliv genetických změn v nádorové tkáni publikovali Rini et al. Ti vytvořili prognostický model zahrnující 16 specifických genů, který umožňuje predikovat DFS u nemocných s lokalizovaným ccRCC (Rini B. et al., 2015). Tento model však nebyl doposud externě validován.

### 1.6.5. Prognostické modely RCC

K hodnocení předpokládaného průběhu onemocnění RCC byla na podkladě dat z velkých studií vytvořena řada prognostických modelů. Proměnnými těchto multivariantních modelů jsou rizikové/prognostické faktory v různých kombinacích – modely typicky vycházejí ze stadiu onemocnění (dle klasifikace TNM), histologických faktorů (nejčastěji jaderný grade, pak například přítomnost intratumorální nekrózy), doplněných o klinické (performance status, přítomnost symptomů) či běžně dostupné laboratorní parametry (CRP, LDH, počet trombocytů, neutrofilů, sérová hodnota kalcia a další).

Výhodou těchto multivariantních modelů je skutečnost, že umožňují přesnější odhad prognózy než samotný stage či grade tumoru. Další výhodou je možnost přidání nového, potenciálně přínosného parametru a vyhodnocení jeho prediktivní hodnoty. Před zavedením nového modelu do praxe je nezbytná jeho externí validace a současně průkaz superiority oproti stávajícím modelům (Ljungberg B. et al., 2022).

V následujícím textu se blíže věnuji zvláště modelům vhodným pro lokalizovaný a metastatický RCC. Existují však i modely použitelné pro všechna stadia RCC, příkladem

může být model SSIGN. Model autorů z Mayo Clinic SSIGN (Stage, Size, Grade, Necrosis) hodnotí CSS u nemocných po chirurgické léčbě ccRCC (nefrektomií), proměnnými modely jsou v názvu popsány anatomické a histologické faktory (Frank I. et al., 2002). V klinické praxi se tyto modely většinou neužívají, vhodné jsou spíše pro vědecké účely.

#### **1.6.5.1. Prognostické modely lokalizovaného onemocnění**

K hodnocení předpokládaného průběhu lokalizovaného RCC byla vyvinuta řada modelů, které stratifikují nemocné do rizikových skupin a jsou tak užitečným nástrojem při volbě optimálního sledování po chirurgickém výkonu. Nejpoužívanějšími jsou model UISS a Leibovichovy modely. Příklady nejčastěji užívaných modelů k predikci průběhu lokalizovaného RCC ukazuje tabulka 4 (Tab. 4.). Nepanuje však jednoznačná shoda, který z těchto modelů by měl být používán v klinické praxi. U žádného z modelů nebyla prokázána superiorita vůči ostatním (Ljungberg B. et al., 2022).

Prognostický model UISS vychází ze základních anatomických a histologických faktorů, které doplňuje o performance status (hodnoceno dle ECOG). Model UISS lze použít pro všechny nejčastější histologické subtypy RCC a hodnotí 5leté přežití bez recidivy (DFS) po léčbě lokalizovaného RCC (Zisman A. et al., 2002).

V roce 2003 představili autoři Leibovich et al. prognostický model k hodnocení rizika progresu a CSS u nemocných po nefrektomii pro lokalizovaný ccRCC. Tento model také vychází z rutinně dostupných anatomických a histologických prognostických faktorů (Leibovich BC. et al., 2003). Upravenou verzi z roku 2018 lze aplikovat nejenom na ccRCC, ale i pRCC a chRCC, kdy pro jednotlivé histologické varianty byly identifikovány specifické rizikové faktory (Leibovich BC. et al., 2018).

Další model použitelný pro všechny nejčastější histologické subtypy RCC je model GRANT (Grade, Age, Nodes and Tumour). Tento model vychází ze snadno dostupných anatomických a histologických parametrů (které jsou obsaženy v názvu modelu) a jeho aplikace je tak velmi snadná (Buti S. et al., 2017).

**Tab. 4. Vybrané prognostické modely k predikci průběhu lokalizovaného RCC**

<b>Model</b>	<b>Rizikové/prognostické faktory</b>	<b>Hodnocení</b>
<b>UISS</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ECOG performance status</li> <li>2. T kategorie</li> <li>3. N kategorie</li> <li>4. Grade</li> </ol>	<p><b>Nízké riziko</b> - T1N0M0G1-2, ECOG PS 0</p> <p><b>Střední riziko</b> - jiné N0M0</p> <p><b>Vysoké riziko</b> - T3N0M0G3-4, ECOG PS <math>\geq</math> 1 nebo T4N0M0</p>
<b>Leibovich 2003</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. T kategorie (pT1a: 0, pT1b: 1, pT2: 3, pT3-4: 4 body)</li> <li>2. N kategorie (pNx/N0: 0, pN+: 2 body)</li> <li>3. Velikost tumoru (&lt; 10 cm: 0, <math>\geq</math> 10 cm: 1 bod)</li> <li>4. Grade (G1-2: 0, G3: 1, G4: 3 body)</li> <li>5. Přítomnost nekrózy (nepřítomná: 0, přítomná: 1 bod)</li> </ol>	<p><b>Nízké riziko:</b> 0-2 body</p> <p><b>Střední riziko:</b> 3-5 bodů</p> <p><b>Vysoké riziko:</b> <math>\geq</math> 6 bodů</p>
<b>GRANT</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Věk &gt; 60 let</li> <li>2. T kategorie = T3b, pT3c nebo pT4</li> <li>3. N kategorie = pN1</li> <li>4. Grade (dle Fuhrmanové) = G3 nebo G4</li> </ol>	<p><b>Příznivá prognóza</b> – 0-1 faktor</p> <p><b>Nepříznivá prognóza</b> – <math>\geq</math> 2 faktorů</p>

Převzato z EAU Guidelines (Ljungberg B. et al., 2022)

RCC: renální karcinom; UISS: University of California Integrated Staging System; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; PS: performance status; GRANT: Grade, Age, Nodes and Tumour.

### 1.6.5.1. Prognostické modely metastatického onemocnění

Prognostické modely jsou u metastatického RCC rutinně užívány k predikci onkologických výsledků systémové léčby. V běžné klinické praxi je v rozhodovacím procesu o optimální léčebné strategii přínosné rozdělení nemocných do rizikových skupin podle prognostických faktorů vytvořených v MSKCC a IMDC (Motzer RJ. et al., 2002; Heng DY. et al., 2013). Tyto prognostické modely shrnuje tabulka (Tab. 5.). Oba modely hodnotí u pacienta míru rizika (nízké, střední a vysoké riziko) a jsou založeny na celkovém výkonnostním stavu pacienta (hodnoceno dle Karnofského indexu), koncentraci hemoglobinu, sérové hladině kalcia a odstupu od stanovení diagnózy do zahájení léčby. V modelu MSKCC je dále zohledněna sérová koncentrace LDH, v IMDC modelu pak počet neutrofilů a trombocytů. Přitom je nutné poznamenat, že až ve 23 % případů nepadají mezi těmito modely shoda, což je spojeno s negativním dopadem na prognózu nemocných s metastatickým onemocněním (Okita K. et al., 2019).

Dle doporučení EAU by měl být v klinické praxi preferenčně užívám model IMDC. Tento model byl recentně použit ve většině aktuálních randomizovaných studií (Ljungberg B. et al., 2022). Zpřesnění toto modelu může dle publikovaných výsledků přinést zahrnutí další proměnné a sice místa primárního výskytu metastáz (mozek, kosti a/nebo játra) (Massari F. et al., 2020). Zdá se, že u středně rizikových nemocných lze dosáhnout zvýšení prediktivní hodnoty přidáním počtu destiček a přítomnosti kostních metastáz (Guida A. et al., 2020; Kang M. et al., 2020).

**Tab. 5. Prognostické modely metastatického RCC**

<b>Model</b>	<b>Rizikové/prognostické faktory</b>	<b>Hodnocení</b>
<b>MSKCC</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Karnofského index &lt; 80 %</li> <li>2. Odstup od stanovení diagnózy &lt; 12 měsíců</li> <li>3. Hemoglobin &lt; dolní hranice normy</li> <li>4. Sérové kalcium &gt; 2,5 mmol/l</li> <li>5. LDH &gt; 1,5násobek horní hranice normy</li> </ol>	<p><b>Dobrá prognóza</b> – žádný rizikový faktor</p> <p><b>Střední prognóza</b> – 1-2 rizikové faktory</p> <p><b>Špatná prognóza</b> – ≥ 3 rizikových faktorů</p>
<b>IMDC</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Karnofského index &lt; 80 %</li> <li>2. Odstup od stanovení diagnózy &lt; 12 měsíců</li> <li>3. Hemoglobin &lt; dolní hranice normy</li> <li>4. Sérové kalcium &gt; 2,5 mmol/l</li> <li>5. Neutrofily &gt; horní hranice normy</li> <li>6. Trombocyty &gt; horní hranice normy</li> </ol>	<p><b>Dobrá prognóza</b> – žádný rizikový faktor</p> <p><b>Střední prognóza</b> – 1-2 rizikové faktory</p> <p><b>Špatná prognóza</b> – ≥ 3 rizikových faktorů</p>

Převzato z EAU Guidelines (Ljungberg B. et al., 2022)

RCC: renální karcinom; MSKCC: Memorial Sloan Kettering Cancer Centre; IMDC: International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium; LDH: laktát dehydrogenáza.



## **1.7. S těhotenstvím asociované proteiny ve vztahu k RCC**

Pro fyziologický růst a vývoj plodu je zásadní vytvoření dobře fungující fetoplacentární jednotky, kde komunikuje krevní oběh matky a plodu. Již v časně fázi embryonálního vývoje placenta produkuje celou řadu proteinů, které jsou detekovatelné v krevním oběhu 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 v procesu angiogeneze v embryonálním vývoji (Maglione D. et al., 1991; Boldt HB. et Conover CA., 2007). Stanovení hladiny PAPP-A se běžně používá v rámci primotrimestrálního screeningu chromozomálních vad plodu, PlGF se využívá k časnému stanovení rizika rozvoje preeklampsie.

K expresi těchto proteinů však dochází i mimo graviditu, kdy se podílí na reparaci a regeneraci tkání. Ovšem hrají roli i v patologických stavech, jakým je například proces kancerogeneze (Autiero M. et al., 2003; Parr C. et al., 2005; Alexiadis M. et al, 2006; Fischer C. et al., 2008; Bulut I. et al., 2009; Mansfield AS. et al., 2014). Studium těchto vybraných s těhotenstvím asociovaných proteinů ve vztahu k RCC bylo předmětem experimentální části disertační práce.

### **1.7.1. S těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A (PAPP-A)**

S těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A či též pappalysin-1 je proteolytický enzym řadící se do skupiny zinkových metaloproteáz. PAPP-A aktivuje signální dráhu IGF-1 (inzulinu podobný růstový faktor 1, insuline like growth factor, IGF-1), která se fyziologicky podílí na regulaci růstu, metabolismu, přežívání a diferenciaci buněk. Hlavním substrátem PAPP-A jsou vazebné proteiny na IGF (insulin like growth factor binding proteins, IGFBPs), zejména pak IGFBP-2, -4 a -5. Proteolýzou těchto inhibičních IGFBPs PAPP-A zvyšuje biologickou dostupnost IGF-1, který se následně může vázat na svůj receptor (IGF-1 receptor, IGF-1R), čímž dochází k aktivaci jeho signální dráhy (IGF-1/PI3K/Akt signální dráha) (Boldt HB. et Conover CA., 2007).

PAPP-A byl poprvé popsán v roce 1974 jako placentární antigen s vysokou koncentrací v plazmě těhotných žen (Lin TM. et al., 1974). Jak název toho proteinu napovídá, je exprimován především v průběhu gravidity v placentárním syncytiotrofoblastu. Je nezbytný

pro normální fetální růst a vývoj (Boldt HB. et Conover CA., 2007). V devadesátých letech 20. století bylo zjištěno, že nízká sérová koncentrace PAPP-A v prvním trimestru gravidity je spojena s vysokým rizikem Downova syndromu u plodu (Wald NJ. et al., 1995). Stanovení hladiny PAPP-A se tak stalo rutinní součástí primotrimestrálního screeningu chromozomálních aberací plodu.

PAPP-A je exprimován v mnoha tkáních i mimo těhotenství, kdy se podílí především na procesu hojení, revaskularizace či kostní remodelace. Současně však PAPP-A hraje roli v řadě patologických procesů, jakými jsou proces vzniku aterosklerózy či ruptura aterosklerotického plátu. Sérová koncentrace PAPP-A byla identifikována jako možný biomarker akutních koronárních syndromů (Bayes-Genis A. et Conover CA., 2001; von Haehling S. et al., 2013). Rovněž renální insuficience je spojena s elevací sérových hladin PAPP-A a současně sérová koncentrace PAPP-A představuje nezávislý prediktor mortality u dlouhodobě dialyzovaných nemocných (Etter C. et al., 2010; Kalousová M. et al., 2012).

Význam PAPP-A v procesu kancerogeneze byl v posledních desetiletích intenzivně studován. 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 (Alexiadis M. et al., 2006; 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 AS. et al., 2002; Parker AS. et al., 2003; Ahmad N. et al., 2004; Tao Y. et al., 2007; Tracz AF. et al., 2016).

#### **1.7.1.1. Polymorfismus genu *PAPP-A***

V roce 1993 byl gen kódující PAPP-A u lidí lokalizován na lokusu 9q33.1 (Silahtaroglu AN et al., 1993). Tento gen má rozsah 200.000 bazí a obsahuje 22 exonů s velikostí od 72 do 1063 nukleotidů (Overgaard MT. et al., 2002).

Genetický polymorfismus je definován jako existence více než jedné alely (varianty genu) v tomtéž lokusu alespoň u 1 % sledované populace. Nejjednodušší formou genového polymorfismu je jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism, SNP),

kdy dochází k záměně jediného nukleotidu v sekvenci DNA. SNP může být přítomen v kódující oblasti genu (exonu), nekódující oblasti genu (intronu) nebo v oblastech mezi geny (intergenic regions). Ani změna v kódující oblasti genu nemusí být spojena se záměnou aminokyselinové sekvence proteinu, který kóduje, neboť stejná aminokyselina může být kódována více kodony. Polymorfismy, které nemají vliv na kódovanou aminokyselinu, označujeme jako synonymní (tzv. tichá mutace). 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).

U genu *PAPP-A* bylo doposud dle údajů Národního centra biotechnologických informací (National Center for Biotechnology Information, NCBI) identifikováno několik tisíc polymorfismů v různých oblastech tohoto genu (NCBI, 2022).

Do současnosti bylo ovšem publikováno pouze omezené množství prací, které se polymorfismem genu *PAPP-A* zabývají. V roce 2006 zveřejnili japonští vědci práci popisující korelaci polymorfismu Ser1224Tyr (rs7020782) genu *PAPP-A* s opakovanými potraty (Suzuki K. et al., 2006). O rok později vyšla práce jihokorejských vědců, kteří hodnotili vztah vybraných polymorfismů genu *PAPP-A* k akutním koronárním syndromům. Alela C SNP C/G (rs13290387) genu *PAPP-A* byla definována jako nezávislý rizikový faktor pro akutní infarkt myokardu (Park S. et al., 2007). Spojitost TT genotypu SNP Cys327Cys (rs12375498) *PAPP-A* s rizikem preeklampsie byla prokázána českými vědci (Muravská A. et al., 2011). Shodný SNP Cys327Cys (rs12375498) byl identifikován i jako faktor ovlivňující přežití (OS) u nemocných s renální insuficiencí vyžadující dlouhodobou dialyzační terapii (Kalousová M. et al., 2014).

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

#### **1.7.1.1. 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. PlGF vykazuje s VEGF značnou homologii (Melincovici CS. et al., 2018).

U zdravého jedince dochází k angiogenezi a vaskulogenezi především v průběhu embryonálního vývoje, v dospělosti pak při reparačních a regeneračních procesech.

Angiogeneze však hraje významnou roli i v patologických procesech, zejména v procesu karcinogeneze. Zvýšená produkce proangiogenních cytokinů je pro novotvorbu cév klíčová. Takto může být zajištěna dostatečná oxygenace nádorových buněk a jejich zásobování živinami, což umožňuje další progresi nádoru (Carmeliet P. et al, 2005).

Původně byl PlGF popsán v lidské placentě. PlGF je produkován buňkami trofoblastu a v průběhu gravidity se jeho exprese zvyšuje (Maglione D. et al., 1991). V těhotenství hraje zásadní roli v regulaci růstu a diferenciaci buněk trofoblastu. Angiogeneze, tedy tvorba nových cév z již existujících endotelových buněk, je klíčová pro utváření zdravé a funkční placenty. Buňky trofoblastu musí být schopné invadovat stěnou dělohy do spirálních arterií a zajistit tak dostatečné cévní zásobení vyvíjejícího se plodu.

V důsledku alternativního sestřihu mRNA (mRNA splicing) existuje PlGF ve čtyřech izoformách: PlGF-1 až PlGF-4, které se liší svou velikostí, místem sekrece a afinitou vazby (Melincovici CS. et al., 2018). Všechny izoformy vykazují afinitu k receptoru pro VEGF (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR-1), který, jak název naznačuje, je exprimován na povrchu endotelových buněk a řadí se do skupiny tyrosinkinázových receptorů. PlGF-2 se navíc váže na koreceptor neuropilin 1 a 2 a heparin. Za normálních podmínek nemá přímý mitogenní účinek, ani neovlivňuje cévní permeabilitu. Za patologických stavů ale amplifikuje signalizaci přes VEGFR-2 a zesiluje VEGF řízenou odpověď (Melincovici CS. et al., 2018).

U zdravých jedinců jsou koncentrace PlGF nízké, ale k jejich nárůstu dochází za patologických stavů, jakými jsou například hypoxie, zánět nebo karcinogeneze (Autiero M. et al., 2003; Fischer C. et al., 2008). Zvýšená exprese PlGF byla prokázána u řady tumorů. Současně byl PlGF identifikován jako možný biomarker nádorové progresi, 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; Soukup V. et al., 2018).

Role PlGF u RCC nebyla doposud zcela objasněna. Do současnosti bylo publikováno pouze velmi málo vědeckých prací zabývajících se touto tematikou. Výsledky dosavadního výzkumu však naznačují, že v hypervaskularizované tkáni RCC je detekovatelná zvýšená exprese PlGF, která koreluje s horším biologickým chováním tumoru (Takahashi A. et al., 1994; Matsumoto K. et al., 2003).

## **2. HYPOTÉZY A CÍLE 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 jeho 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 onemocnění 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 u pacientů s ccRCC**

#### **Hypotéza:**

PlGF je protein z rodiny růstových faktorů VEGF, s nimiž vykazuje značnou homologii. 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. Po operačním výkonu byli nemocní dále sledováni v souladu s aktuálními doporučeními EAU.

Kontrolní skupina byla tvořena zdravými dobrovolníky (odpovídajícího věku i zastoupení pohlaví) s negativní anamnézou stran předchozího onkologického onemocnění.

Všechny studie byly prováděny v souladu s principy Helsinské deklarace a byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Všichni účastníci zapojení do studie podepsali před zařazením informovaný souhlas.

Laboratorní analýzy byly provedeny na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy pod vedením prof. MUDr. Marty Kalousové, Ph.D.

Pro větší přehlednost je metodika rozpracována zvlášť pro jednotlivé experimenty. Užití statistické metody byly shodné, proto jsou souhrnně uvedeny v závěru tohoto oddílu textu.

#### **3.1. Metodika – experimentální práce I: Význam sérových koncentrací PAPP-A u nemocných s ccRCC**

##### **Charakteristika studijní skupiny**

Do studie bylo zařazeno celkem 121 pacientů (78 mužů, 43 žen, průměrný věk  $63,4 \pm 10,5$  let), kteří podstoupili nefrektomii či resekci ledviny pro ccRCC v období od července 2011 do srpna 2015. Při histopatologickém vyšetření preparátů u všech operovaných patolog popsal negativní chirurgické okraje.

Pro statistickou analýzu jsme nemocné rozdělili do tří skupin: pacienti s lokalizovaným ccRCC bez relapsu onemocnění (lccRCC,  $n = 80$ ), pacienti s lokalizovaným ccRCC s následným relapsem onemocnění v průběhu sledování (rccRCC,  $n = 26$ ) a pacienti s primárně metastatickým onemocněním (mccRCC,  $n = 15$ ).



Staging onemocnění byl proveden podle aktuální klasifikace TNM, jaderný grade byl hodnocen dle Fuhrmanové. Všichni nemocní byli po chirurgickém výkonu sledováni v souladu s aktuálními doporučeními EAU. Průměrná doba sledování činila 4,6 let.

Základní charakteristiky nemocných s ccRCC, u kterých jsme hodnotili sérové koncentrace PAPP-A, shrnuje následující tabulka (Tab. 6.).

**Tab. 6. Základní parametry pacientů s ccRCC**

Počet pacientů (muži/ženy)	121 (78/43)
Průměrný věk (roky)	63,4±10,5
Stage	
I	78 (64,4 %)
II	4 (3,3 %)
III	24 (19,8 %)
IV	15 (12,4 %)
Grade (dle Fuhrmanové)	
G1	36 (29,8 %)
G2	59 (48,8 %)
G3	18 (14,9 %)
G4	8 (6,6 %)

ccRR: světlóuněčný renální karcinóm.

U všech nemocných s ccRCC jsme předoperačně stanovili sérovou koncentraci PAPP-A. Ve skupině pacientů s lccRCC (n = 23) a rccRCC (n = 14) jsme odběr krve ke stanovení PAPP-A opakovali ještě 3 týdny a 3 měsíce po operačním výkonu.

Kontrolní skupinu tvořilo 69 zdravých dobrovolníků (35 mužů, 34 žen, průměrný věk 58,1±4,7 let), všichni bez předchozího onkologického onemocnění, u kterých jsme vstupně provedli na Urologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole základní uro-onkologický screening, včetně ultrazvukového vyšetření urogenitálního traktu, cytologického vyšetření moči a stanovení hodnoty PSA u mužů.

## **Krevní vzorky**

Vzorek krve byl pacientů odebrán ráno nalačno punkcí kubitální žíly současně s odběry pro rutinní kontrolní vyšetření. Pro analýzu PAPP-A byla krev v centrifuze odstředěna (rychlost 3000 otáček za minutu) a získané sérum jsme uchovali při teplotě -80 °C až do doby provedení analýzy.

## **Laboratorní analýza**

Ke stanovení sérové hodnoty PAPP-A byla použita metoda TRACE (time resolved amplified cryptate emission) 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* u nemocných s RCC a onkocytomem**

### **Charakteristika studijní skupiny**

Do této studie bylo zařazeno celkem 454 pacientů (302 mužů, 152 žen, průměrný věk 63±11 let), kteří podstoupili resekci ledviny či nefrektomii pro RCC v období od dubna 2007 do srpna 2015. Histopatologické vyšetřením preparátu prokázalo následující výsledky – u 374 nemocných byl zjištěn ccRCC, u 19 pRCC typ I (pIRCC), u 14 pRCC typ II (pIIRCC), u 12 chRCC a u 35 onkocytom. Základní charakteristiky souboru nemocných ukazují následující tabulky (Tab. 7., Tab. 8.).

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

**Tab.7. Základní parametry pacientů**

Počet pacientů (muži/ženy)	454 (302/152)
Průměrný věk (roky)	63±11
<b>Histologie</b>	
ccRCC	374 (82,4 %)
pIRCC	19 (4,2 %)
pIIRCC	14 (3,1 %)
chRCC	12 (2,6 %)
onkocytom	35 (7,7 %)

ccRCC: světlóuněčný renální karcinom; pIRCC: papilární renální karcinom typ I; pIIRCC: papilární renální karcinom typ II; chRCC: chromofóbní renální karcinom.

**Tab. 8. Základní parametry pacientů s ccRCC**

Počet pacientů (muži/ženy)	374 (239/135)
Průměrný věk (roky)	63±11,1
<b>Stage</b>	
I	240 (64,2 %)
II	39 (10,4 %)
III	52 (13,9 %)
IV	43 (11,5 %)
<b>Grade (dle Fuhrmanové)</b>	
G1	104 (27,8 %)
G2	193 (51,6 %)
G3	53 (14,2 %)
G4	24 (6,6 %)

ccRCC: světlóuněčný renální karcinom.

Kontrolní skupinu v tomto experimentu tvořilo 145 zdravých dobrovolníků (65 mužů, 80 žen, průměrný věk 49±14 let) všichni bez předchozího onkologického onemocnění. Shodná kontrolní skupina byla použita i v předchozí studii provedené v souvislosti s genetickou analýzou 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).

### **Krevní vzorky, laboratorní analýza**

Vzorek krve byl pacientům odebrán ráno nalačno před operačním výkonem punkcí kubitální žíly současně s odběry pro rutinní kontrolní vyšetření. K analýze DNA byla krev odebrána do zkumavek s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Izolace DNA byla provedena pomocí AutoGen FLEX STAR dle pokynů výrobce. DNA byla následně uchována při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Genetická analýza**

Sledovali jsme dva vybrané polymorfismy genu *PAPP-A* – C/G SNP (rs13290387) a Cys327Cys SNP (rs12375498). Polymorfismus C/G SNP (rs13290387) je lokalizován na intronu 6 a Cys327Cys SNP (rs12375498) na exonu 2 genu *PAPP-A*. Vybrané polymorfismy *PAPP-A* byly analyzovány pomocí sekvenace DNA (Sangerovo sekvenování) postupem popsaným dle Muravská et al. (Muravská A. et al, 2011). V první fázi byly cílové úseky DNA obsahující polymorfní 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 (ddNTP). Tyto fragmenty byly následně sekvenovány dle pokynů výrobce v sekvenátoru CEQ™ 8000 (Beckman Coulter, USA).

### **3.3. Metodika – experimentální práce III: Význam sérových koncentrací PIGF u nemocných s ccRCC**

#### **Charakteristika studijní skupiny**

Do této studie bylo zařazeno 49 pacientů (30 mužů, 19 žen, průměrný věk  $62,9\pm 10,6$  let), kteří podstoupili resekci ledviny či nefrektomii pro ccRCC v období od června 2011 do června 2013. Při histopatologickém vyšetření preparátů popsal patolog u všech operovaných negativní chirurgické okraje.

K dalšímu srovnání byly pacienti rozděleni do tří podskupin a to následovně: 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 operačním výkonu dále sledováni v souladu s aktuálními doporučeními EAU. Průměrná doba sledování byla 4,4 let. Během sledování došlo k relapsu u 8 nemocných (podskupina rccRCC) a 17 subjektů zemřelo.

Následující tabulka shrnuje základní charakteristiky nemocných s ccRCC, u nichž byla provedena analýza sérových koncentrací PIGF (Tab. 9.).

**Tab. 9. Základní parametry nemocných s ccRCC**

Počet pacientů (muži/ženy)	49 (30/19)
Průměrný věk (roky)	62,9±10,6
Stage	
I	23 (46,9 %)
II	1 (2 %)
III	15 (30,6 %)
IV	10 (20,4 %)
Grade (dle Fuhrmanové)	
G1	10 (20,4 %)
G2	31 (63,3 %)
G3	5 (10,2 %)
G4	3 (6,1 %)

ccRCC: světlobuněčný renální karcinom.

U všech nemocných s ccRCC byla měřena sérová koncentrace PIGF před operačním výkonem. U nemocných s původně lokalizovaným onemocněním byl odběr krve ke stanovení PIGF opakován 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 vstupním uro-onkologickém screeningu (viz metodika experimentální práce I).

### **Krevní vzorky**

Vzorek krve byl pacientům odebrán ráno nalačno punkcí kubitální žíly současně s odběry pro rutinní kontrolní vyšetření. Pro analýzu PIGF byla krev v centrifuze odstředěna (rychlost 3000 otáček za minutu) a získané sérum bylo následně uchováváno při teplotě -80 °C až do analýzy.

### **Laboratorní analýza**

K hodnocení sérové koncentrace PIGF byla použita metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) za použití standardních souprav určených k provádění této analýzy (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) podle pokynů výrobců. Výsledky jsou vyjádřeny v pikogramech na mililitr (pg/ml).

### **3.4. Statistická analýza**

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka (standard deviation, SD) pro spojitě proměnné a v procentech pro kategorické proměnné. Pro spojitě proměnné jsme rozdíl 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 (receiver operating characteristics, ROC) analýzu. Cut-off hodnota pro identifikaci ccRCC či pro riziko relapsu byla určena jako hodnota s nejvyšším součtem senzitivity a specifity. Kvalita testu byla specifikována plochou pod křivkou (area under the ROC curve, 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 CSS a OS.

Hladina významnosti statistických testů byla stanovena na  $p < 0,05$ . Analýzy dat byly provedeny pomocí statistického software MedCalc pro Windows, verze 13.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgie).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Výsledky – experimentální práce I: Význam sérových koncentrací PAPP-A u nemocných s ccRCC

V našem souborů jsme neprokázali statisticky významný rozdíl sérových koncentrací PAPP-A mezi pacienty s ccRCC a kontrolní skupinou ( $8,74 \pm 3,5$  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 u jednotlivých podskupin nemocných znázorňuje následující tabulka (Tab. 10.).

**Tab. 10. 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.

PAPP-A: s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A, ccRCC: světlobuněčný renální karcinom; lccRCC: lokalizovaný světlobuněčný RCC bez relapsu; rccRCC: lokalizovaný světlobuněčný RCC s následným relapsem; mccRCC: metastatický světlobuněčný RCC.



Neprokázali jsme žádný vliv předoperační ani pooperační (3 měsíce po výkonu) koncentrace PAPP-A na CSS či OS. Výsledky znázorňují následující tabulky (Tab. 11., Tab. 12.).

**Tab. 11. Nádorově specifické přežití (CSS) u pacientů s lokalizovaným ccRCC**

	<b>PAPP-A (mIU/l)</b>	<b>Počet pacientů</b>	<b>Relaps</b>	<b>HR (CI)</b>	<b>p hodnota</b>
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.

CSS: nádorově specifické přežití; ccRCC: světlóuněčný renální karcinom; PAPP-A: s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A; HR: poměr rizik; CI: interval spolehlivosti.

**Tab. 12. Celkové přežití (OS) u pacientů s lokalizovaným ccRCC**

	<b>PAPP-A (mIU/l)</b>	<b>Počet pacientů</b>	<b>Exitus</b>	<b>HR (CI)</b>	<b>p hodnota</b>
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.

CSS: nádorově specifické přežití; ccRCC: světlóuněčný renální karcinom; PAPP-A: s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A; HR: poměr rizik; CI: interval spolehlivosti.

## 4.2. Výsledky – experimentální práce II: Polymorfismus genu *PAPP-A* u nemocných s RCC a onkocytomem

### 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 kontrolní skupinou. Mutantní alelu G jsme detekovali u nemocných s pIRCC v 60,7 % případů, v kontrolní skupině pouze v 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 % v kontrolní skupině; 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;  $p = 0,045$ ).

Mezi dalšími histologickými subtypy RCC a onkocytomem jsme v porovnání s kontrolní skupinou neprokázali statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypu C/G SNP (rs13290387) ( $p > 0,05$ ). Výsledky genetické analýzy C/G SNP (rs13290387) jsou zobrazeny v následující tabulce (Tab. 13.).

V podskupině nemocných s ccRCC jsme nezjistili žádný statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel nebo genotypů C/G SNP (rs13290387) *PAPP-A* v závislosti na stádiu onemocnění ani jaderném gradu nádoru ( $p > 0,05$ ). Rovněž jsme neprokázali žádný vliv zkoumaného polymorfismu genu *PAPP-A* na přežití nemocných ( $p > 0,05$ ).

**Tab. 13. Genetická analýza C/G SNP (rs13290387) genu *PAPP-A***

Histologie	Alela, genotyp	Počet	Podíl (%)	Kontrolní skupina	Podíl (%)	P	OR	95 % CI	<i>p</i> hodnota
ccRCC (n = 374)	C	446	59,6	179	61,7				
	G	302	40,4	111	38,3	0,582			
	CC	135	36,1	57	39,3				
	CG	176	47,1	65	44,8	0,605			
	GG	63	16,8	23	15,9	0,720			
	CG+GG	239	63,9	88	61,7	0,562			
pIRCC (n = 19)	C	27	71,1	179	61,7				
	G	11	28,9	111	38,3	0,347			
	CC	9	47,4	57	39,3				

	CG	9	47,4	65	44,8	1,0			
	GG	1	5,2	23	15,9	0,376			
	CG+GG	10	52,6	88	61,7	0,671			
<b>pIRCC</b> (n = 14)	C	11	39,3	179	61,7				
	G	17	60,7	111	38,3	0,021	2,49	1,13- 5,52	0,024
	CC	1	7,1	57	39,3				
	CG	9	64,3	65	44,8	0,028	7,65	0,94- 62,3	0,057
	GG	4	28,6	23	15,9	0,018	9,91	1,05- 93,5	0,045
	CG+GG	13	92,3	88	61,7	0,019	8,23	1,05- 64,65	0,045
<b>chRCC</b> (n = 12)	C	15	62,5	179	61,7				
	G	9	37,5	111	38,3	0,884			
	CC	5	41,7	57	39,3				
	CG	5	41,7	65	44,8	0,896			
	GG	2	16,7	23	15,9	0,670			
	CG+GG	7	58,3	88	61,7	0,882			
<b>Onkocytom</b> (n = 35)	C	47	67,1	179	61,7				
	G	23	32,9	111	38,3	0,481			
	CC	17	48,6	57	39,3				
	CG	13	37,1	65	44,8	0,439			
	GG	5	14,3	23	15,9	0,770			
	CG+GG	18	51,4	88	61,7	0,419			

P – originální hladina významnosti rozdílu mezi frekvencí alel a genotypů u pacientů s ccRCC a kontrolní skupinou

*p* – hladina významnosti po Bonferroniho korekci

Statistiky významné výsledky jsou uvedeny kurzívou.

SNP: jednonukleotidový polymorfismus; PAPP-A: s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A; P: hladina významnosti před Bonferroniho korekcí; OR: odds ratio; CI: interval spolehlivosti; ccRCC: světlóuněčný renální karcinom; pIRCC: papilární renální karcinom typ I; pIIIRCC: papilární renální karcinom typ II; chRCC: chromofóbní renální karcinom.

### Cys327Cys SNP (rs12375498) *PAPP-A*

Genetická analýza Cys327Cys SNP (rs12375498) genu *PAPP-A* neprokázala signifikantní rozdíl ve frekvenci alel a genotypů tohoto polymorfismu mezi zkoumanými subtypy RCC ani onkocytomu v porovnání s kontrolní skupinou ( $p > 0,05$ ). Výsledky genetické analýzy Cys327Cys SNP (rs12375498) *PAPP-A* znázorňuje následující tabulka (Tab. 14.).

V podskupině nemocných s ccRCC jsme nezjistili žádný statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel nebo genotypů Cys327Cys SNP (rs12375498) v závislosti na stádiu onemocnění ani jaderném gradu ( $p > 0,05$ ). Rovněž jsme neprokázali žádný vliv zkoumaného polymorfismu genu *PAPP-A* na přežití nemocných ( $p > 0,05$ ).

**Tab. 14. Genetická analýza Cys327Cys SNP (rs12375498) *PAPP-A***

Histologie	Alela, genotyp	Počet	Podíl (%)	Kontrolní skupina	Podíl (%)	P	OR	95 % CI	<i>p</i> hodnota
ccRCC (n = 374)	C	569	79,1	220	75,9				
	T	179	23,9	70	24,1	0,943			
	CC	216	57,8	79	54,5				
	CT	137	36,6	62	42,8	0,339			
	TT	21	5,6	4	2,7	0,345			
	CT+CC	158	42,2	66	45,5	0,564			
pIRCC (n = 19)	C	29	76,3	220	75,9				
	T	9	23,7	70	24,1	0,887			
	CC	11	57,9	79	54,5				
	CT	7	36,8	62	42,8	0,874			
	TT	1	5,3	4	2,7	0,855			
	CT+CC	8	42,1	66	45,5	0,974			
pIIIRCC (n = 14)	C	25	89,3	220	75,9				
	T	3	10,7	70	24,1	0,107			
	CC	11	78,6	79	54,5				
	CT	3	21,4	62	42,8	0,104			
	TT	0	0	4	2,7	0,459			
	CT+CC	14	100	66	45,5	0,362			
chRCC (n = 12)	C	16	66,7	220	75,9				
	T	8	33,3	70	24,1	0,449			

	CC	5	41,7	79	54,5				
	CT	6	50,0	62	42,8	0,715			
	TT	1	8,3	4	2,7	0,765			
	CT+CC	7	58,3	66	45,5	0,579			
<b>Onkocytom</b> (n = 35)	C	56	80	220	75,9				
	T	14	20	70	24,1	0,563			
	CC	23	65,7	79	54,5				
	CT	10	28,6	62	42,8	0,215			
	TT	2	5,7	4	2,7	0,912			
	CT+CC	12	34,3	66	45,5	0,310			

P – originální hladina významnosti rozdílu mezi frekvencí alel a genotypů u pacientů s ccRCC a kontrolní skupinou

p – hladina významnosti po Bonferroniho korekci

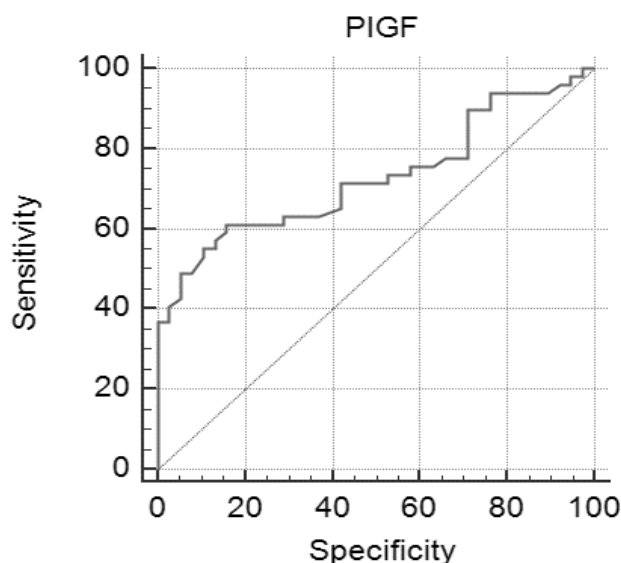
Výsledky nejsou statisticky významné.

SNP: jednonukleotidový polymorfismus; PAPP-A: s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A; P: hladina významnosti před Bonferroniho korekcí; OR: odds ratio; CI: interval spolehlivosti; ccRCC: světlóuněčný renální karcinom; pIRCC: papilární renální karcinom typ I; pIIRCC: papilární renální karcinom typ II; chRCC: chromofóbní renální karcinom.

### 4.3. Výsledky – experimentální práce III: Význam sérových koncentrací PIGF u nemocných s ccRCC

#### PIGF v diagnostice ccRCC

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



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

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

PIGF: placentární růstový faktor; ccRCC: světló buněčný renální karcinom; AUC: plocha pod ROC křivkou.

V předoperačních odběrech 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;  $p = 0,002$ ). Nejistili jsme však žádný statisticky významný rozdíl hodnot mezi podskupinami nemocných s rccRCC a lccRCC nebo mccRCC. Rovněž jsme neprokázali, že by sérová koncentrace PIGF korelovala se stádiem onemocnění (T1-T2 vs. T3-T4;  $p = 0,76$ ) či jaderným gradem (G1-G2 vs. G3-G4;  $p = 0,07$ ).

### **Prognostický význam PIGF u ccRCC**

V odběrech provedených tři měsíce po operačním výkonu 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 ale nebyl statisticky významný ( $p = 0,17$ ).

Následující tabulka ukazuje všechny koncentrace PIGF v séru (Tab. 15.).

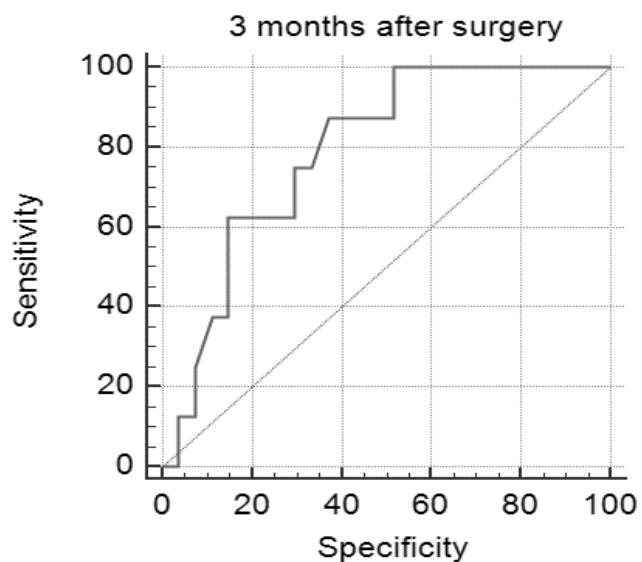
**Tab. 15. Sérové koncentrace PIGF**

<b>PIGF (pg/mL)</b>	<b>ccRCC</b>			<b>Kontrolní skupina</b>	<b>p hodnota</b>
Předoperačně	<b>16,1±10,5</b>			<b>10,5±2,4</b>	p = 0,002
	<b>Podskupiny ccRCC</b>				
	<b>lccRCC</b>	<b>rccRCC</b>	<b>mccRCC</b>		
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.

PIGF: placentární růstový faktor; ccRCC: světlobuněčný renální karcinom; lccRCC: lokalizovaný světlobuněčný RCC bez relapsu; rccRCC: lokalizovaný světlobuněčný RCC s následným relapsem; mccRCC: metastatický světlobuněčný RCC.

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



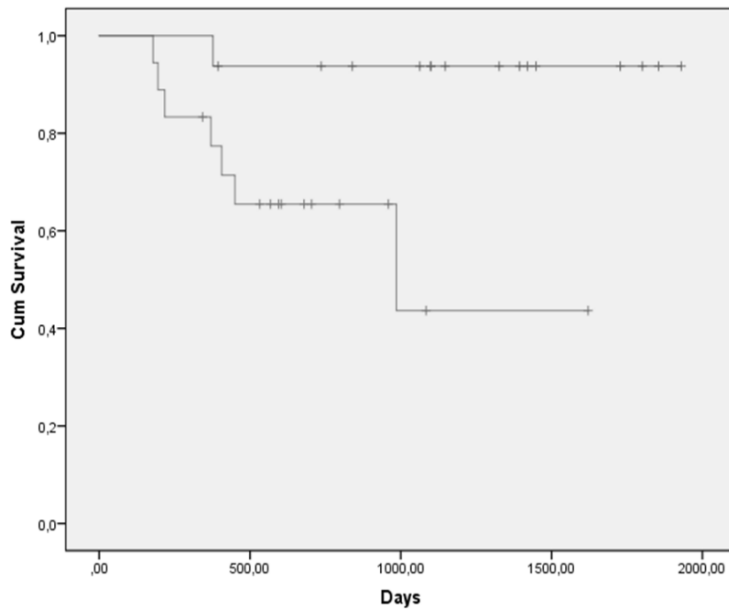
**Obr. 2. Cut-off hodnota sérové koncentrace PlGF pro riziko relapsu ccRCC**

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

PlGF: placenární růstový faktor; ccRCC: světlóbuněčný renální karcinóm; AUC: plocha pod ROC křivkou.



Tříleté 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 % ve srovnání s 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)**

Kaplan-Meierovy křivky 3letého 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 %.

CSS: nádorově specifické přežití; PlGF: placentární růstový faktor.

## 5. DISKUSE

RCC představuje 5 % všech malignit u mužů a 3 % u žen, ročně je diagnostikován u více než 400.000 pacientů (Bray F. et al., 2018; Siegel RL. et al., 2020). Incidence této malignity v České republice se dlouhodobě řadí k nejvyšším ve světě (Dušek L. et al., data aktuální k roku 2018). I přesto, že v současnosti vzhledem k častějšímu užívání zobrazovacích vyšetření narůstá počet náhodně zachycených tumorů nízkého stadia, je pokročilé onemocnění zjištěno až ve třetině všech případů (Siegel RL. et al., 2020; Ljungberg B. et al., 2022). Individuální průběh RCC bývá obtížně predikovatelný. U 20-40 % pacientů se po kurativní chirurgické léčbě původně lokalizovaného onemocnění setkáváme s relapsem (Speed JM. et al., 2017). Proces kancerogeneze u této malignity nebyl zatím zcela objasněn a výzkumné snahy o nalezení vhodného biomarkeru, který by přispěl ke zlepšení diagnostiky či lepšímu odhadu prognózy nemocných zatím nebyly příliš úspěšné.

Cílem naší práce bylo hodnocení vztahu dvou vybraných s těhotenstvím asociovaných proteinů – PAPP-A a PlGF – k ccRCC a jejich potenciálního přínosu v diagnostice a hodnocení prognózy nemocných s tímto onemocněním. Oba tyto proteiny představují regulátory buněčného růstu a proliferace, a jejich role byla prokázána u řady malignit a patologických stavů. Vyšetření sérových koncentrací těchto proteinů se navíc rutinně používá v ne-onkologickém gynekologickém screeningu. Dále jsme zkoumali vztah vybraných polymorfismů genu *PAPP-A* k riziku rozvoje RCC a onkocytomu.

### 5.1. Diskuse – experimentální práce I: Význam sérových koncentrací PAPP-A u nemocných s ccRCC

PAPP-A je metaloproteáza, která degraduje inhibiční vazebné proteiny IGF-1, čímž zvyšuje jeho biologickou dostupnost a podílí se tak na aktivaci jím spouštěné signální dráhy. Stimulace IGF-1R vede ke zvýšení proliferace, iniciaci maligní transformace, dediferenciaci buněk a inhibici apoptózy (Samani AA. et al., 2006; Seccareccia E. et al., 2012; Weroha SJ. et al., 2012). Souvislost mezi zvýšenými hladinami IGF-1, případně nadměrnou expresí (overexpression) IGF-1R, a zvýšeným 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). Z tohoto důvodů byla testována i řada molekul ovlivňující IGF-1 signální dráhu v protinádorové terapii (Pollak M., 2012).

Role IGF-1 a IGF-1R byla potvrzena i při rozvoji RCC (Tao Y. et al., 2007; Tracz AF. et al., 2016). Práce autorů z Mayo Clinic ukazuje na korelaci zvýšené exprese IGF-1R s horší prognózou nemocných s ccRCC (Parker AS. et al., 2002; Parker AS. et al., 2003). Další američtí autoři následně prokázali vztah mezi expresí IGF-1R a vyšším jaderným gradem a současně horší prognózou nemocných (Ahmad N. et al., 2004). Zajímavým zjištěním je skutečnost, že exprese IGF-1R je inhibována *VHL* tumor supresorovým genem. IGF-1R je tedy exprimován ve zvýšené míře u tumorů s inaktivací tohoto genu. A současně vysoká exprese IGF-1R přispívá k chemorezistenci nádorových buněk (Yuen JS. et al., 2009).

Doposud publikované výsledky naznačují, že PAPP-A se uplatňuje v procesu kancerogeneze u řady tumorů. Vztah PAPP-A a karcinomu plic zkoumal turecký autorský kolektiv, který prokázal zvýšené sérové koncentrace PAPP-A u nemocných s touto malignitou v porovnání s kontrolní skupinou (Bulut I. et al., 2009). Další studie navíc ukázala, že proteolytická aktivita PAPP-A akceleruje růst buněk karcinomu plic a obráceně, pokles PAPP-A sekrece vede ke zpomalení nádorového růstu *in vivo* na myším modelu (Pan H. et al., 2012). Recentní práce dánských autorů se zabývala rolí PAPP-A a jeho homologu PAPP-A2 u bronchogenního karcinomu. Prokázali zvýšení sérových hladin PAPP-A2, nikoli však PAPP-A, u nemocných s touto malignitou oproti kontrolní skupině. Navíc zjistili korelaci nárůstu sérové koncentrace PAPP-A2 s vyšší mortalitou nemocných (Hjortebjerg R. et al., 2020).

Autoři Mansfield et al. prokázali expresi PAPP-A v nádorových buňkách karcinomu prsu. Současně zjistili vyšší rozsah a intenzitu exprese PAPP-A ve vzorcích s více agresivními variantami tumoru (Mansfield AS. et al., 2014). Další studie demonstrovaly, že nadměrná exprese PAPP-A v buňkách ovariálního karcinomu podporuje nádorový růst, zvyšuje vaskularizaci a metastatický potenciál nádorových buněk (Boldt HB. et Conover CA., 2011).

Ovlivnění proteolytické aktivity PAPP-A bylo zkoumáno i jako možný cíl protinádorové léčby. Jako první demonstrovali účinnost monoklonální protilátky proti PAPP-A v protinádorové terapii vědci z Aarhuské univerzity. Na myších modelech prokázali, že intraperitoneální podání jimi vytvořené monoklonální protilátky proti PAPP-A vede k inhibici růstu buněk karcinomu plic (Mikkelsen JH. et al., 2014). Účinnost monoklonální protilátky proti PAPP-A v protinádorové léčbě na myších modelech prokázali i američtí vědci, kteří popsali zpomalení růstu ovariálního karcinomu a současně snížení objemu nádorového ascitu (Becker MA. et al., 2015). Dále vědci zjistili, že u myší při vyřazení genu kódujícího PAPP-A (PAPP-A knock-out mice) dochází v důsledku snížené signalizace

cestou IGF-1R k oddálení vzniku neoplázií i degenerativních změn spojených s procesem stárnutí organismu (Conover CA. et al., 2010; Keenan KP. et Marler RJ., 2010). V dalším výzkumu byl PAPP-A 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. Pro naši práci jsme vycházeli z poznatku, že PAPP-A zvyšuje biologickou dostupnost IGF-1, čímž umožňuje aktivaci jeho signální dráhy, jejíž význam byl v procesu kancerogeneze u RCC opakovaně potvrzen. Proto jsme se rozhodli analyzovat sérové koncentrace PAPP-A u nemocných s ccRCC a vyhodnotit jejich případný význam v diagnostice a následně ve stanovení prognózy nemocných s tímto histologickým subtypem RCC.

Výsledky však nenaplnily naše očekávání a naše hypotézy se nám nepodařilo potvrdit. V naší studijní kohortě jsme neprokázali významný rozdíl sérových koncentrací PAPP-A mezi nemocnými s ccRCC a kontrolní skupinou. Nejistili jsme korelaci sérových hladin 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 hodnot PAPP-A na přežití. Na základě našich výsledků lze tedy usuzovat, že sérová koncentrace PAPP-A se nezdá být vhodným biomarkerem pro diagnostiku, pooperační sledování, ani hodnocení prognózy u nemocných s ccRCC.

## **5.2. Diskuse – experimentální práce II: Polymorfismus genu *PAPP-A* u nemocných s RCC a onkocytomem**

Jak již bylo uvedeno v předchozím textu, tak aktivace IGF-1 signální dráhy je spojena se zvýšením proliferace, iniciací maligní transformace, dediferenciací a inhibicí apoptózy (Samani AA. et al., 2006; Seccareccia E. et al, 2012; Weroha SJ. et al., 2012). Rovněž byl popsán vztah mezi zvýšenými koncentracemi IGF-1, případně nadměrnou expresí IGF-1R a rizikem rozvoje různých tumorů, včetně RCC (Tao Y. et al., 2007; Roddam AW. et al., 2008; Belfiore A. and Frasca F., 2008; Key TJ. et al., 2010; Tracz AF. et al., 2016). Zásadním krokem v regulaci této signální dráhy je ovlivnění aktivity volného IGF-1. Biologická aktivita IGF-1 je antagonizována šesti IGF-1BPs, které se na IGF-1 vážou s různou afinitou a zabraňují tak jeho vazbě na receptor a spuštění buněčné signalizace. Proteáz, jejichž

substrátem jsou IGF-1BPs, je více, a jednou z nich je právě PAPP-A. Mezi inhibitory proteázové aktivity PAPP-A se řadí například stanniocalciny. Stanniocalciny tak nepřímo ovlivňují biologickou dostupnost IGF-1 a představují další úroveň regulace jím spouštěné signální dráhy. Vztahem stanniocalcinu-1 k ccRCC se zabývali kolegové Sobotka et al. z Všeobecné fakultní nemocnice. Ti zjistili vyšší koncentraci stanniocalcinu-1 u pacientů s generalizovaným RCC v porovnání s nemocnými s lokalizovaným onemocněním. Současně prokázali negativní prognostický význam vysoké koncentrace stanniocalcinu-1 na RFS (Sobotka R. et al., 2018).

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.

Předchozí studie hodnotily vybrané SNP genu *PAPP-A*. U specifických polymorfismů genu *PAPP-A*, rs7020782 a rs12375498 byla identifikována korelace s rizikem opakovaných potratů, rozvojem gestačního diabetes mellitus, tvorbou aterosklerotických plátů v karotidách 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 polymorfismu rs12375498 s rizikem rozvoje preeklampsie (Muravská A. et al., 2011). Současně byl tento polymorfismus identifikován i jako nezávislý faktor ovlivňující OS u dlouhodobě dialyzovaných pacientů (Kalousová M. et al., 2014). V této práci autoři současně zkoumali vztah vybraného genového polymorfismu k sérovým koncentracím PAPP-A. Na poměrně velkém souboru jedinců (n = 464, 319 dlouhodobě dialyzovaných pacientů, kontrolní skupina 145 zdravých dobrovolníků) nebyl prokázán vliv polymorfismu 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. Cílem naší experimentální práce bylo hodnocení dvou vybraných 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) genu *PAPP-A* mezi pacienty s pIRCC v porovnání s kontrolní skupinou. U

nemocných s pIRCC jsme popsali vyšší výskyt mutantní alely G. Dále jsme zjistili vyšší frekvenci genotypu GG a GG + CG. U dalších histologickými subtypů RCC a onkocytomu jsme nezjistili v porovnání s kontrolní skupinou žádný statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel a vybraných genotypů *PAPP-A*.

U nemocných s ccRCC, který představuje nejčastější histologický typ RCC a shodně byl i v naší studijní kohortě patology popsán nejčastěji (n = 374, 82,4 %), jsme nezjistili žádný statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel nebo genotypů vybraných polymorfismů genu *PAPP-A*. Rovněž jsme neprokázali žádný vliv vybraných polymorfismů na přežití. Výsledky tak naznačují, že C/G SNP (rs13290387) ani Cys327Cys SNP (rs12375498) genu *PAPP-A* nesusouvisí s rizikem vzniku ccRCC.

Naše výsledky genetické analýzy naznačují možnou souvislost mezi C/G SNP (rs13290387) genu *PAPP-A* a rizikem rozvoje pIRCC. Limitací naší práce je však malý počet nemocných s tímto histologickým subtypem RCC (n = 14), kdy navíc genotyp CC byl prokázán pouze u jedné osoby. Ověření na větším souboru je proto velmi žádoucí.

### **5.3. Diskuse – experimentální práce III: Význam sérových koncentrací PlGF u nemocných s ccRCC**

Schopnost novotvorby cév, angiogeneze, hraje klíčovou roli v procesu kancerogeneze, nádorové progresi a schopnosti zakládat vzdálené metastázy. VEGF je považován za nejsilnější ze známých proangiogenních faktorů, proto byl v minulých desetiletích intenzivně studován. PlGF řadíme do rodiny růstových faktorů VEGF a jeho zvýšená exprese je spojena především s patologickou angiogenezí. Zvýšené hladiny PlGF byly popsány u mnoha patologických stavů, a to včetně nádorového růstu. Navíc, řada publikovaných vědeckých 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; Song N. et al., 2015; Meng Q. et al., 2018).

Přesto, že role PlGF jako potenciálního biomarkeru v diagnostice a hodnocení prognózy byla intenzivně zkoumána u řady malignit, jeho význam u RCC nebyl doposud zcela objasněn.

Jako první se rolí PlGF u RCC zabývali ve své práci autoři Takahashi et al. z Tokijské univerzity. Na malém souboru pacientů prokázali zvýšenou expresi VEGF i PlGF v hypervaskularizované nádorové tkáni. Současně zjistili, že exprese těchto proangiogenních faktorů v normální tkáni ledviny není přítomna. Autoři tak postulovali, že oba zkoumané růstové faktory přispívají k neovaskularizaci i u RCC (Takahashi A. et al., 1994). Dalším vědeckým kolektivem zabývajícím se významem PlGF u RCC byli japonští autoři Matsumoto et al., kteří hodnotili sérové koncentraci PlGF ve vztahu k základním anatomickým a histologickým parametrům RCC. Tito autoři ve své práci popsali korelaci hladin PlGF s T a M stádiem nádoru, jaderným gradem a vaskularizací tumoru. Současně v multivariantní analýze potvrdili PlGF jako nezávislý prognostický faktor (Matsumoto K. et al., 2003).

Cílem naší práce bylo zhodnocení sérových koncentrací PlGF u nemocných operovaných pro ccRCC. Nejprve jsme hodnotili potenciální přínos PlGF v diagnostice ccRCC. Ve shodě s předchozími pracemi jsme prokázali významně vyšší sérovou koncentraci PlGF u nemocných s ccRCC v porovnání se skupinou zdravých, věkově odpovídajících dobrovolníků. Jako cut-off hodnotu sérové koncentrace PlGF pro riziko detekce ccRCC jsme stanovili koncentraci 12,71 pg/ml, která dosahovala specifity 84,21 % a senzitivity 61,22 % ( $p = 0,0001$ ). Na podkladě našich výsledků lze tedy sérovou koncentraci PlGF považovat za potenciální biomarker pro detekci ccRCC. Ovšem vzhledem k AUC a dosaženým citlivostem testu lze uvažovat o užití PlGF spíše pouze v rámci multi-markerového testu než jako samostatného biomarkeru.

V námi sledovaném souboru nemocných s ccRCC jsme neprokázali 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 hladiny statistické významnosti (G1-G2 vs. G3-G4;  $p = 0,07$ ). Důvodem mohl být malý počet nemocných v naší studii při současném vyšším zastoupení tumorů nižšího stagingu i gradingu.

V další části experimentu jsme hodnotili význam sérové koncentrace PlGF v predikci relapsu ccRCC a hodnocení prognózy u nemocných s lokalizovaných ccRCC. V krevních vzorcích odebraných 3 měsíce po operačním výkonu jsme pozorovali vyšší koncentrace PlGF u nemocných, u nichž následně došlo k recidivě onemocnění (podskupina rccRCC) v porovnání s nemocnými bez recidivy (podskupina lccRCC). Tyto rozdíly však nedosáhly statistické významnosti. Jako cut-off hodnotu pro riziko relapsu jsme stanovili sérovou

koncentraci PIGF = 11,41 pg/ml, která poskytovala specificitu 62,96 % a senzitivitu 87,5 % s AUC 0,792. Zajímavé jsou výsledky 3letého CSS našich pacientů při použití této cut-off hodnoty. Nemocní s koncentrací PIGF pod touto hodnotou vykazovali CSS vyšší než 90 % v porovnání s nemocnými s koncentrací PIGF pod touto cut-off hodnotou (93 % vs. 61 %). Na základě těchto výsledků můžeme postulovat, že sérová koncentrace PIGF 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 PIGF v nádorové tkáni. Primárním cílem naší práce však bylo hodnocení významu sérových hladin PIGF. Je zřejmé, že získání cirkulujících biomarkeru je pro pacienta zatíženo menší invazivitou. Navíc v současné době má PIGF významné postavení v ne-onkologickém gynekologickém screeningu (časné hodnocení rizika preeklapsie u těhotných žen), což vedlo ke zlepšení dostupnosti a přesnosti tohoto testu. Vezme-li se v potaz, že RCC nemá žádný vhodný diagnostický, ani prognostický biomarker, PIGF 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 použitelných 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 kontrolní skupinou. Rovněž jsme nezjistili závislost sérových koncentrací PAPP-A na stadiu onemocnění ani jaderném gradu. Ani dynamika koncentrací PAPP-A ve vzorcích odebraných s odstupem 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 biomarker ccRCC, ani jako prediktor prognózy tohoto onemocnění.

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 kontrolní skupinou. U dalších histologických subtypů RCC ani onkocytomu jsme žádné významné rozdíly ve frekvenci alel a genotypů v porovnání s kontrolní skupinou nezjistili. Ve skupině pacientů s ccRCC jsme nezjistili žádný statisticky významný rozdíl ve frekvenci alel či genotypů vybraných SNP genu *PAPP-A* v závislosti na stadiu 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 však malý počet nemocných s tímto histologickým subtypem, ověření na větším souboru je tedy nezbytné.

V rámci třetího experimentu jsme zkoumali význam sérových koncentrací PlGF u nemocných s ccRCC a opět jsme hodnotili jejich potenciální přínos v diagnostice, pooperačním sledování a pro hodnocení prognózy. U nemocných s ccRCC jsme zjistili významně vyšší sérové koncentrace PlGF v porovnání s kontrolní skupinou. Výsledky tak potvrdily naši hypotézu. Korelaci sérových hladin PlGF se stadiem onemocnění a

jaderným gradem jsme ale nepotvrdili. Přesto, že jsme pozorovali vyšší hodnoty PIGF u nemocných s tumory vykazující horší jaderný grade, rozdíly nedosáhly statistické hladiny významnosti, což ale mohlo být způsobeno malým počtem nemocných ve studii při současném vyšším zastoupení tumorů nižšího stagingu a gradingu. V pooperačním sledování nemocných s lokalizovaným ccRCC jsme pozorovali vyšší koncentrace PIGF 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 PIGF pro riziko relapsu ccRCC, která korelovala s CSS. Z našich výsledků lze tedy usuzovat, že PIGF se jeví jako potenciální diagnostický a prognostický biomarker ccRCC, přičemž je ale nutné ověření výsledků na větší experimentální skupině.

Závěrem naší práce lze uvést, že PIGF, 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. Práce nabízí ucelený přehled prognostických faktorů RCC a dosud známých potenciálních biomarkerů.

V experimentální části práce jsme hodnotili dva potenciální biomarkery – PAPP-A a PIGF – 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.

PIGF, klíčový aktivátor angiogeneze, byl identifikován jako prognostický biomarker u řady malignit. Analyzovali jsme sérové koncentrace PIGF u osob s ccRCC (lokalizovaný ccRCC bez relapsu, lokalizovaný ccRCC s následným relapsem, primárně metastatické onemocnění). Sérová hladina PIGF byla významně vyšší u osob s ccRCC v porovnání s kontrolami ( $p = 0,002$ ). Cut-off hodnota PIGF pro riziko 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.humphath.2004.05.012. PMID: 15343516.
2. Albiges L, Hakimi AA, Xie W, McKay RR, Simantov R, Lin X, Lee JL, Rini BI, Srinivas S, Bjarnason GA, Ernst S, Wood LA, Vaishamayan UN, Rha SY, Agarwal N, Yuasa T, Pal SK, Bamias A, Zabor EC, Skanderup AJ, Furberg H, Fay AP, de Velasco G, Preston MA, Wilson KM, Cho E, McDermott DF, Signoretti S, Heng DY, Choueiri TK. Body Mass Index and Metastatic Renal Cell Carcinoma: Clinical and Biological Correlations. *J Clin Oncol.* 2016 Oct 20;34(30):3655-3663. doi: 10.1200/JCO.2016.66.7311. PMID: 27601543; PMCID: PMC5065111.
3. 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.
4. Autiero M, Lutun 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.
5. Bagheri M, Speakman JR, Shemirani F, Djafarian K. Renal cell carcinoma survival and body mass index: a dose-response meta-analysis reveals another potential paradox within a paradox. *Int J Obes (Lond).* 2016 Dec;40(12):1817-1822. doi: 10.1038/ijo.2016.171. Epub 2016 Sep 30. PMID: 27686524.
6. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR Jr, Virmani R, O'xvig C, Schwartz RS. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2001 Oct 4;345(14):1022-9. doi: 10.1056/NEJMoa003147. PMID: 11586954.
7. Becker MA, Haluska P Jr, Bale LK, O'xvig 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.
8. 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.
  9. Bensalah K, Leray E, Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Tostain J, Guillé F, Patard JJ. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2006 Mar;175(3 Pt 1):859-63. doi: 10.1016/S0022-5347(05)00526-4. PMID: 16469566.
  10. Bensalah K, Pantuck AJ, Rioux-Leclercq N, Thuret R, Montorsi F, Karakiewicz PI, Mottet N, Zini L, Bertini R, Salomon L, Villers A, Soulie M, Bellec L, Rischmann P, De la Taille A, Avakian R, Crepel M, Ferriere JM, Bernhard JC, Dujardin T, Pouliot F, Rigaud J, Pfister C, Albouy B, Guy L, Joniau S, van Poppel H, Leuret T, Culty T, Saint F, Zisman A, Raz O, Lang H, Spie R, Wille A, Roigas J, Aguilera A, Rambeaud B, Martinez Piñero L, Nativ O, Farfara R, Richard F, Roupret M, Doehn C, Bastian PJ, Muller SC, Tostain J, Beldegrun AS, Patard JJ. Positive surgical margin appears to have negligible impact on survival of renal cell carcinomas treated by nephron-sparing surgery. *Eur Urol*. 2010 Mar;57(3):466-71. doi: 10.1016/j.eururo.2009.03.048. Epub 2009 Mar 31. PMID: 19359089.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi:

- 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
15. Brenner W, Färber G, Herget T, Lehr HA, Hengstler JG, Thüroff JW. Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2002 May 1;99(1):53-7. doi: 10.1002/ijc.10303. doi: 10.1002/ijc.10303. PMID: 11948491.
16. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Eds.). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons 2017. Český překlad TNM verze 2011 available at: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=4577>.
17. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999 Jul 8;234(2):177-86. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00219-x. PMID: 10395891.
18. Brookman-May S, May M, Ficarra V, Kainz MC, Kampel-Kettner K, Kohlschreiber S, Wenzl V, Schneider M, Burger M, Wieland WF, Otto W, Tilki D, Gilfrich C, Hohenfellner M, Pahernik S, Chromecki TF, Stief C, Zigeuner R; Members of the CORONA (Collaborative Research On Renal Neoplasms Association) Project. Does preoperative platelet count and thrombocytosis play a prognostic role in patients undergoing nephrectomy for renal cell carcinoma? Results of a comprehensive retrospective series. *World J Urol*. 2013 Oct;31(5):1309-16. doi: 10.1007/s00345-012-0931-0. Epub 2012 Aug 19. PMID: 22903790.
19. Bui MH, Visapaa H, Seligson D, Kim H, Han KR, Huang Y, Horvath S, Stanbridge EJ, Palotie A, Figlin RA, Belldegrun AS. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *J Urol*. 2004 Jun;171(6 Pt 1):2461-6. doi: 10.1097/01.ju.0000116444.08690.e2. PMID: 15126876.
20. 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.
21. Buti S, Puligandla M, Bersanelli M, DiPaola RS, Manola J, Taguchi S, Haas NB. Validation of a new prognostic model to easily predict outcome in renal cell carcinoma: the GRANT score applied to the ASSURE trial population. *Ann Oncol*. 2017 Nov 1;28(11):2747-2753. doi: 10.1093/annonc/mdx492. Erratum in: *Ann Oncol*. 2018 Jul 1;29(7):1604. PMID: 28945839; PMCID: PMC5815563.
22. 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.
23. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932-6. doi: 10.1038/nature04478. PMID: 16355210.
24. 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.
25. Cho D, Signoretti S, Dabora S, Regan M, Seeley A, Mariotti M, Youmans A, Polivy A, Mandato L, McDermott D, Stanbridge E, Atkins M. Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2007 Sep;5(6):379-85. doi: 10.3816/CGC.2007.n.020. PMID: 17956710.
26. Choi JE, You JH, Kim DK, Rha KH, Lee SH. Comparison of perioperative outcomes between robotic and laparoscopic partial nephrectomy: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*. 2015 May;67(5):891-901. doi: 10.1016/j.eururo.2014.12.028. Epub 2015 Jan 6. PMID: 25572825.
27. Choi Y, Park B, Jeong BC, Seo SI, Jeon SS, Choi HY, Adami HO, Lee JE, Lee HM. Body mass index and survival in patients with renal cell carcinoma: a clinical-based cohort and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2013 Feb 1;132(3):625-34. doi: 10.1002/ijc.27639. Epub 2012 Jun 20. PMID: 22610826.
28. Choueiri TK, Vaziri SA, Jaeger E, Elson P, Wood L, Bhalla IP, Small EJ, Weinberg V, Sein N, Simko J, Golshayan AR, Sercia L, Zhou M, Waldman FM, Rini BI, Bukowski RM, Ganapathi R. von Hippel-Lindau gene status and response to vascular endothelial growth factor targeted therapy for metastatic clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*. 2008 Sep;180(3):860-5; discussion 865-6. doi: 10.1016/j.juro.2008.05.015. Epub 2008 Jul 17. PMID: 18635227.
29. Conover CA, Bale LK, Mader JR, Mason MA, Keenan KP, Marler RJ. Longevity and age-related pathology of mice deficient in pregnancy-associated plasma protein-A. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010 Jun;65(6):590-9. doi: 10.1093/gerona/glq032. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20351075; PMCID: PMC2869530.
30. Čechová M, Chocholatý M, Babjuk M, Kalousová M, Zima T. Prognostické faktory renálního karcinomu. *Rozhl Chir*. *in press*.



31. 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.
32. Dagher J, Delahunt B, Rioux-Leclercq N, Egevad L, Srigley JR, Coughlin G, Duglinson N, Gianduzzo T, Kua B, Malone G, Martin B, Preston J, Pokorný M, Wood S, Yaxley J, Samarasinghe H. Clear cell renal cell carcinoma: validation of World Health Organization/International Society of Urological Pathology grading. *Histopathology.* 2017 Dec;71(6):918-925. doi: 10.1111/his.13311. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28718911.
33. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, Egevad L, Algaba F, Moch H, Grignon DJ, Montironi R, Srigley JR; Members of the ISUP Renal Tumor Panel. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. *Am J Surg Pathol.* 2013 Oct;37(10):1490-504. doi: 10.1097/PAS.0b013e318299f0fb. PMID: 24025520.
34. Driessen A, Landuyt W, Pastorekova S, Moons J, Goethals L, Haustermans K, Naftoux P, Penninckx F, Geboes K, Lerut T, Ectors N. Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas. *Ann Surg.* 2006 Mar;243(3):334-40. doi: 10.1097/01.sla.0000201452.09591.f3. PMID: 16495697; PMCID: PMC1448952.
35. 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.
36. 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.
37. Escudero-Esparza A, Martin TA, Davies ML, Jiang WG. PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2, in colorectal cancer and the prognostic significance. *Cancer Genomics Proteomics.* 2009 Jul-Aug;6(4):239-46. PMID: 19657001.

38. Etter C, Straub Y, Hersberger M, Rätz HR, Kistler T, Kiss D, Wüthrich RP, Gloor HJ, Aerne D, Wahl P, Klaghofer R, Ambühl PM. Pregnancy-associated plasma protein-A is an independent short-time predictor of mortality in patients on maintenance haemodialysis. *Eur Heart J*. 2010 Feb;31(3):354-9. doi: 10.1093/eurheartj/ehp429. Epub 2009 Oct 21. PMID: 19850559.
39. Fan Y, Li H, Ma X, Gao Y, Chen L, Li X, Bao X, Du Q, Zhang Y, Zhang X. Prognostic Significance of Hypoxia-Inducible Factor Expression in Renal Cell Carcinoma: A PRISMA-compliant Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Sep;94(38):e1646. doi: 10.1097/MD.0000000000001646. PMID: 26402839; PMCID: PMC4635779.
40. 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.
41. Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol*. 2002 Dec;168(6):2395-400. doi: 10.1097/01.ju.0000035885.91935.d5. PMID: 12441925.
42. Golijanin B, Pereira J, Mueller-Leonhard C, Golijanin D, Amin A, Mega A, Boorjian SA, Thompson RH, Leibovich BC, Gershman B. The natural history of renal cell carcinoma with isolated lymph node metastases following surgical resection from 2006 to 2013. *Urol Oncol*. 2019 Dec;37(12):932-940. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.08.003. Epub 2019 Sep 27. PMID: 31570248.
43. Goymer, P. Synonymous mutations break their silence. *Nat Rev Genet*. 2007;8:92. Doi:10.1038/nrg2056.
44. Guida A, Le Teuff G, Alves C, Colomba E, Di Nunno V, Derosa L, Flippot R, Escudier B, Albiges L. Identification of international metastatic renal cell carcinoma database consortium (IMDC) intermediate-risk subgroups in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2020 Dec 8;11(49):4582-4592. doi: 10.18632/oncotarget.27762. PMID: 33346231; PMCID: PMC7733622.
45. 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.
46. Han WK, Alinani A, Wu CL, Michaelson D, Loda M, McGovern FJ, Thadhani R, Bonventre JV. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Apr;16(4):1126-34. doi: 10.1681/ASN.2004070530. Epub 2005 Mar 2. PMID: 15744000; PMCID: PMC1307501.
47. 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.
48. Heng DY, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, Mackenzie M, Wood L, Donskov F, Tan MH, Rha SY, Agarwal N, Kollmannsberger C, Rini BI, Choueiri TK. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2013 Feb;14(2):141-8. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70559-4. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23312463; PMCID: PMC4144042.
49. Hes O, Hora M, Pitra T, Šedivcová M, Kolář J, Veselá A, Fiala O. Nové perspektivní jednotky: nádory ledvin popsané v době po WHO histopatologické klasifikaci z roku 2016. *Ces Urol* 2020; 24(3): 183–190.
50. Hjortebjerg R, Espelund U, Rasmussen TR, Folkersen B, Steiniche T, Georgsen JB, Oxvig C, Frystyk J. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A2 Is Associated With Mortality in Patients With Lung Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 2;11:614. doi: 10.3389/fendo.2020.00614. PMID: 32982990; PMCID: PMC7492290.
51. 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.

52. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørli T, Hovig E, Smith-Sørensen B, Montesano R, Harris CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1994 Sep;22(17):3551-5. PMID: 7937055; PMCID: PMC308317.
53. 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.
54. Huang H, Pan XW, Huang Y, Xu DF, Cui XG, Li L, Hong Y, Chen L, Gao Y, Yin L. Microvascular invasion as a prognostic indicator in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Jul 15;8(7):10779-92. PMID: 26379872; PMCID: PMC4565255.
55. Hussain SA, Ganesan R, Reynolds G, Gross L, Stevens A, Pastorek J, Murray PG, Perunovic B, Anwar MS, Billingham L, James ND, Spooner D, Poole CJ, Rea DW, Palmer DH. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2007 Jan 15;96(1):104-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6603530. PMID: 17213826; PMCID: PMC2360224.
56. Jabs WJ, Busse M, Krüger S, Jocham D, Steinhoff J, Doehn C. Expression of C-reactive protein by renal cell carcinomas and unaffected surrounding renal tissue. *Kidney Int.* 2005 Nov;68(5):2103-10. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00666.x. PMID: 16221209.
57. Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, Landberg G, Ljungberg B. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2004 Feb;93(3):297-302. doi: 10.1111/j.1464-410x.2004.04605.x. PMID: 14764126.
58. Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, Parasramka M, Ho TH, Cheville JC, Frenkel E, Parker AS, Brugarolas J. Clear Cell Renal Cell Carcinoma Subtypes Identified by BAP1 and PBRM1 Expression. *J Urol.* 2016 Jan;195(1):180-7. doi: 10.1016/j.juro.2015.07.113. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26300218; PMCID: PMC5221690.
59. Kalousova M, Benáková H, Kuběna AA, Dusilová-Sulková S, Tesař V, Zima T. Pregnancy-associated plasma protein A as an independent mortality predictor in

- long-term hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res.* 2012;35(3):192-201. doi: 10.1159/000332086. Epub 2011 Nov 25. PMID: 22123284.
60. 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.
61. Kang M, Choi J, Kim J, Sung HH, Jeon HG, Jeong BC, Jeon SS, Lee HM, Park SH, Song C, Seo SI. Prognostic Impact of Bone Metastasis on Survival Outcomes in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated by First Line Tyrosine Kinase Inhibitors: A Propensity-Score Matching Analysis. *J Cancer.* 2020 Oct 18;11(24):7202-7208. doi: 10.7150/jca.48062. PMID: 33193883; PMCID: PMC7646162.
62. Kapur P, Peña-Llopis S, Christie A, Zhrebker L, Pavía-Jiménez A, Rathmell WK, Xie XJ, Brugarolas J. Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. *Lancet Oncol.* 2013 Feb;14(2):159-167. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70584-3. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23333114; PMCID: PMC4674067.
63. Karakiewicz PI, Hutterer GC, Trinh QD, Jeldres C, Perrotte P, Gallina A, Tostain J, Patard JJ. C-reactive protein is an informative predictor of renal cell carcinoma-specific mortality: a European study of 313 patients. *Cancer.* 2007 Sep 15;110(6):1241-7. doi: 10.1002/cncr.22896. PMID: 17639589.
64. Karakiewicz PI, Trinh QD, Lam JS, Tostain J, Pantuck AJ, Belldegrun AS, Patard JJ. Platelet count and preoperative haemoglobin do not significantly increase the performance of established predictors of renal cell carcinoma-specific mortality. *Eur Urol.* 2007 Nov;52(5):1428-36. doi: 10.1016/j.eururo.2007.03.036. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17420085.
65. Katz MD, Serrano MF, Grubb RL 3rd, Skolarus TA, Gao F, Humphrey PA, Kibel AS. Percent microscopic tumor necrosis and survival after curative surgery for renal cell carcinoma. *J Urol.* 2010 Mar;183(3):909-14. doi: 10.1016/j.juro.2009.11.010. Epub 2010 Jan 18. PMID: 20083280.
66. Keegan KA, Schupp CW, Chamie K, Hellenthal NJ, Evans CP, Koppie TM. Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: survival differences by

- subtype and stage. *J Urol.* 2012 Aug;188(2):391-7. doi: 10.1016/j.juro.2012.04.006. Epub 2012 Jun 13. PMID: 22698625; PMCID: PMC3714400.
67. Keenan KP, Marler RJ. Longevity and age-related pathology of mice deficient in pregnancy-associated plasma protein-A. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010 Jun;65(6):590-9. doi: 10.1093/gerona/glq032. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20351075; PMCID: PMC2869530.
68. Klatte T, Said JW, de Martino M, Larochelle J, Shuch B, Rao JY, Thomas GV, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Presence of tumor necrosis is not a significant predictor of survival in clear cell renal cell carcinoma: higher prognostic accuracy of extent based rather than presence/absence classification. *J Urol.* 2009 Apr;181(4):1558-64; discussion 1563-4. doi: 10.1016/j.juro.2008.11.098. Epub 2009 Feb 23. PMID: 19230920.
69. Klatte T, Seligson DB, LaRochelle J, Shuch B, Said JW, Riggs SB, Zomorodian N, Kabbinavar FF, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Mar;18(3):894-900. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0786. Epub 2009 Feb 24. PMID: 19240241.
70. Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD, Yu H, Kabbinavar FF, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 15;13(24):7388-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0411. PMID: 18094421.
71. Kolář J, Pitra T, Pivovarovčiková K, Jaklová R, Zavoral T, Trávníček I, Sedláčková H, Procházková K, Vaněček T, Hes O, Hora M. Hereditární renální nádorové syndromy. *Ces. Urol.* 2020;24(1):26-41.
72. Kroeger N, Rampersaud EN, Patard JJ, Klatte T, Birkhäuser FD, Shariat SF, Lang H, Rioux-Leclercq N, Remzi M, Zomorodian N, Kabbinavar FF, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Prognostic value of microvascular invasion in predicting the cancer specific survival and risk of metastatic disease in renal cell carcinoma: a multicenter investigation. *J Urol.* 2012 Feb;187(2):418-23. doi: 10.1016/j.juro.2011.10.024. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22177164.
73. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Frank I, Kwon ED, Weaver AL, Parker AS, Zincke H. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer.* 2003 Apr 1;97(7):1663-71. doi: 10.1002/cncr.11234. PMID: 12655523.

74. Leibovich BC, Lohse CM, Cheville JC, Zaid HB, Boorjian SA, Frank I, Thompson RH, Parker WP. Predicting Oncologic Outcomes in Renal Cell Carcinoma After Surgery. *Eur Urol.* 2018 May;73(5):772-780. doi: 10.1016/j.eururo.2018.01.005. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29398265.
75. Leibovich BC, Lohse CM, Crispen PL, Boorjian SA, Thompson RH, Blute ML, Cheville JC. Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. *J Urol.* 2010 Apr;183(4):1309-15. doi: 10.1016/j.juro.2009.12.035. Epub 2010 Feb 19. PMID: 20171681.
76. Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J, Kwon ED. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2007 Oct 20;25(30):4757-64. doi: 10.1200/JCO.2007.12.1087. PMID: 17947723.
77. Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1129-35. PMID: 15709180.
78. Lin F, Zhang PL, Yang XJ, Shi J, Blasick T, Han WK, Wang HL, Shen SS, Teh BT, Bonventre JV. Human kidney injury molecule-1 (hKIM-1): a useful immunohistochemical marker for diagnosing renal cell carcinoma and ovarian clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2007 Mar;31(3):371-81. doi: 10.1097/01.pas.0000213353.95508.67. PMID: 17325478.
79. Lin TM, Galbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins. *Am J Obstet Gynecol.* 1974 Jan 15;118(2):223-36. doi: 10.1016/0002-9378(74)90553-5. PMID: 4129188.
80. Liu S, Tian Z, Zhang L, Hou S, Hu S, Wu J, Jing Y, Sun H, Yu F, Zhao L, Wang R, Tseng HR, Zhau HE, Chung LW, Wu K, Wang H, Wu JB, Nie Y, Shao C. Combined cell surface carbonic anhydrase 9 and CD147 antigens enable high-efficiency capture of circulating tumor cells in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget.* 2016 Sep 13;7(37):59877-59891. doi: 10.18632/oncotarget.10979. PMID: 27494883; PMCID: PMC5312355.
81. 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/>.
82. 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.
83. Maher ER. Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J Urol*. 2018 Dec;36(12):1891-1898. doi: 10.1007/s00345-018-2288-5. Epub 2018 Apr 21. PMID: 29680948; PMCID: PMC6280834.
84. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2002 Jul 1;100(1):30-6. doi: 10.1002/ijc.10450. PMID: 12115583.
85. 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.
86. Massari F, Di Nunno V, Guida A, et al. Addition of primary metastatic site on bone, brain, and liver to IMDC criteria in patients with metastatic renal cell carcinoma: A validation study. *Clin Genitourin Cancer* 2021;19(1):32–40. doi:10.1016/j.clgc.2020.06.003.
87. 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.
88. Måseide K, Kandel RA, Bell RS, Catton CN, O'Sullivan B, Wunder JS, Pintilie M, Hedley D, Hill RP. Carbonic anhydrase IX as a marker for poor prognosis in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Jul 1;10(13):4464-71. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0541. PMID: 15240538.
89. 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.



90. 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.
91. 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.
92. Minardi D, Lucarini G, Milanese G, Di Primio R, Montironi R, Muzzonigro G. Loss of nuclear BAP1 protein expression is a marker of poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2016 Aug;34(8):338.e11-8. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.03.006. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27085487.
93. 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.
94. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002 Jan 1;20(1):289-96. doi: 10.1200/JCO.2002.20.1.289. PMID: 11773181.
95. 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.
96. 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/>.
97. Noon AP, Vlatković N, Polański R, Maguire M, Shawki H, Parsons K, Boyd MT. p53 and MDM2 in renal cell carcinoma: biomarkers for disease progression and future therapeutic targets? *Cancer.* 2010 Feb 15;116(4):780-90. doi: 10.1002/cncr.24841. PMID: 20052733; PMCID: PMC3536467.
98. Ohashi R, Martignoni G, Hartmann A, Calìo A, Segala D, Stöhr C, Wach S, Erlmeier F, Weichert W, Autenrieth M, Schraml P, Rupp NJ, Ohe C, Otsuki Y, Kawasaki T, Kobayashi H, Kobayashi K, Miyazaki T, Shibuya H, Usuda H, Umezū H, Fujishima

- F, Furusato B, Okita K, Hatakeyama S, Tanaka T, et al. Impact of disagreement between two risk group models on prognosis in patients with metastatic renal-cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2019;17(3):e440–e446. doi:10.1016/j.clgc.2019.01.006.
99. Osakabe M, Sugai T, Kuroda N, Tsuzuki T, Nagashima Y, Ajioka Y, Moch H. Multi-institutional re-evaluation of prognostic factors in chromophobe renal cell carcinoma: proposal of a novel two-tiered grading scheme. *Virchows Arch.* 2020 Mar;476(3):409-418. doi: 10.1007/s00428-019-02710-w. Epub 2019 Nov 23. Erratum in: *Virchows Arch.* 2020 Mar 10;: PMID: 31760491.
100. Overgaard MT, Sorensen ES, Stachowiak D, Boldt HB, Kristensen L, Sottrup-Jensen L, Oxvig C. Complex of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment. *J Biol Chem.* 2003 Jan 24;278(4):2106-17. doi: 10.1074/jbc.M208777200. Epub 2002 Nov 5. PMID: 12421832.
101. 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.
102. Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Belldegrun AS, Figlin RA. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer.* 2007 Jun 1;109(11):2257-67. doi: 10.1002/cncr.22677. PMID: 17440983.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. Parker AS, Kosari F, Lohse CM, Houston Thompson R, Kwon ED, Murphy L, Riehle DL, Blute ML, Leibovich BC, Vasmataz G, Chevillie JC. High expression levels of survivin protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer.* 2006 Jul 1;107(1):37-45. doi: 10.1002/cncr.21952. PMID: 16736510.
107. 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.
108. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Guillé F, Chopin DK, Mulders PF, Wood CG, Swanson DA, Figlin RA, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 20;23(12):2763-71. doi: 10.1200/JCO.2005.07.055. PMID: 15837991.
109. Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, Nakano M, Kamei S, Deguchi T, Hirose Y. Prognostic value of the co-expression of carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2008 Sep;20(3):525-30. PMID: 18695901.
110. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer.* 2012 Feb 16;12(3):159-69. doi: 10.1038/nrc3215. PMID: 22337149.
111. 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.
112. Porpiglia F, Mari A, Bertolo R, Antonelli A, Bianchi G, Fidanza F, Fiori C, Furlan M, Morgia G, Novara G, Rocco B, Rovereto B, Serni S, Simeone C, Carini M, Minervini A. Partial Nephrectomy in Clinical T1b Renal Tumors: Multicenter Comparative Study of Open, Laparoscopic and Robot-assisted Approach (the RECORD Project). *Urology.* 2016 Mar;89:45-51. doi: 10.1016/j.urology.2015.08.049. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26743388.

113. 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.
114. Radfar MH, Ameri F, Dadpour M, Khabazian R, Borumandnia N, Kabir SA. Partial nephrectomy and positive surgical margin, oncologic outcomes and predictors: a 15-year single institution experience. *Cent European J Urol*. 2021;74(4):516-522. doi: 10.5173/ceju.2021.0191. Epub 2021 Dec 6. PMID: 35083070; PMCID: PMC8771139.
115. Rini B, Goddard A, Knezevic D, Maddala T, Zhou M, Aydin H, Campbell S, Elson P, Koscielny S, Lopatin M, Svedman C, Martini JF, Williams JA, Verkarre V, Radulescu C, Neuzillet Y, Hemmerlé I, Timsit MO, Tsiatis AC, Bonham M, Lebre T, Mejean A, Escudier B. A 16-gene assay to predict recurrence after surgery in localised renal cell carcinoma: development and validation studies. *Lancet Oncol*. 2015 Jun;16(6):676-85. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70167-1. Epub 2015 May 12. PMID: 25979595.
116. Rini BI, Jaeger E, Weinberg V, Sein N, Chew K, Fong K, Simko J, Small EJ, Waldman FM. Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status. *BJU Int*. 2006 Oct;98(4):756-62. doi: 10.1111/j.1464-410X.2006.06376.x. Epub 2006 Jul 7. PMID: 16827904.
117. Rioux-Leclercq N, Fergelot P, Zerrouki S, Leray E, Jouan F, Bellaud P, Epstein JI, Patard JJ. Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Hum Pathol*. 2007 Oct;38(10):1489-95. doi: 10.1016/j.humpath.2007.02.014. Epub 2007 Jun 26. PMID: 17597181.
118. 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, Vogelmann 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.
119. 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.
120. Sacco E, Pinto F, Sasso F, Racioppi M, Gulino G, Volpe A, Bassi P. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urol Int.* 2009;83(1):1-11. doi: 10.1159/000224860. Epub 2009 Jul 27. Erratum in: *Urol Int.* 2010;85(4):483. PMID: 19641351.
121. Scelo G, Muller DC, Riboli E, Johansson M, Cross AJ, Vineis P, Tsilidis KK, Brennan P, Boeing H, Peeters PHM, Vermeulen RCH, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Severi G, Perduca V, Kvaskoff M, Trichopoulou A, La Vecchia C, Karakatsani A, Palli D, Sieri S, Panico S, Weiderpass E, Sandanger TM, Nøst TH, Agudo A, Quirós JR, Rodríguez-Barranco M, Chirlaque MD, Key TJ, Khanna P, Bonventre JV, Sabbisetti VS, Bhatt RS. KIM-1 as a Blood-Based Marker for Early Detection of Kidney Cancer: A Prospective Nested Case-Control Study. *Clin Cancer Res.* 2018 Nov 15;24(22):5594-5601. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1496. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30037816; PMCID: PMC6239904.
122. Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol.* 2002 Feb;196(2):186-93. doi: 10.1002/path.1034. PMID: 11793370.
123. 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.
124. Seda CJ, Salas AS, Sánchez CG, Blasco JM, García IO, Sánchez JM, Ruíz CB, Navarro SM, López RA. Thrombocytosis and hematocrit as prognostic factors in renal carcinoma. *Arch Esp Urol.* 2011 Nov;64(9):883-90. English, Spanish. PMID: 22155876.
125. Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster WS, Zincke H, Blute ML, Cheville JC, Kwon ED. Histologic coagulative tumor necrosis

- as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer*. 2005 Aug 1;104(3):511-20. doi: 10.1002/cncr.21206. PMID: 15973740.
126. Shao Y, Wu B, Jia W, Zhang Z, Chen Q, Wang D. Prognostic value of pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Urol*. 2020 Jul 6;20(1):90. doi: 10.1186/s12894-020-00665-8. PMID: 32631294; PMCID: PMC7339475.
127. 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.
128. Silahdaroglu 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.
129. Sim SH, Messenger MP, Gregory WM, Wind TC, Vasudev NS, Cartledge J, Thompson D, Selby PJ, Banks RE. Prognostic utility of pre-operative circulating osteopontin, carbonic anhydrase IX and CRP in renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2012 Sep 25;107(7):1131-7. doi: 10.1038/bjc.2012.360. Epub 2012 Aug 23. PMID: 22918393; PMCID: PMC3461155.
130. Sobotka R, Capoun O, Hanus T, Zima T, Kalousova M, Soukup V. The importance of serum osteopontin and stanniocalcin-1 in renal cell carcinoma. *Neoplasma*. 2018 Nov 15;65(6):958-964. doi: 10.4149/neo\_2018\_171123N759. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29940774.
131. 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.
132. 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.
133. 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.

134. Springer D, Valík D, Kučera R, et al. Doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klin Biochem Metab.* 2021;29 (50):41–55.
135. Steffens S, Köhler A, Rudolph R, Eggers H, Seidel C, Janssen M, Wegener G, Schrader M, Kuczyk MA, Schrader AJ. Validation of CRP as prognostic marker for renal cell carcinoma in a large series of patients. *BMC Cancer.* 2012 Sep 8;12:399. doi: 10.1186/1471-2407-12-399. PMID: 22958305; PMCID: PMC3502607.
136. Sun M, Shariat SF, Cheng C, Ficarra V, Murai M, Oudard S, Pantuck AJ, Zigeuner R, Karakiewicz PI. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol.* 2011 Oct;60(4):644-61. doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.041. Epub 2011 Jun 30. PMID: 21741163.
137. 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.
138. Tahbaz R, Schmid M, Merseburger AS. Prevention of kidney cancer incidence and recurrence: lifestyle, medication and nutrition. *Curr Opin Urol.* 2018 Jan;28(1):62-79. doi: 10.1097/MOU.0000000000000454. PMID: 29059103.
139. 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.
140. 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.
141. Tellini R, Antonelli A, Tardanico R, Fisogni S, Veccia A, Furlan MC, Carobbio F, Cozzoli A, Zanotelli T, Simeone C. Positive Surgical Margins Predict Progression-free Survival After Nephron-sparing Surgery for Renal Cell Carcinoma: Results From a Single Center Cohort of 459 Cases With a Minimum Follow-up of 5 Years. *Clin Genitourin Cancer.* 2019 Feb;17(1):e26-e31. doi: 10.1016/j.clgc.2018.08.004. Epub 2018 Aug 23. PMID: 30266249.

142. 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.
143. Turajlic S, Xu H, Litchfield K, Rowan A, Chambers T, Lopez JI, Nicol D, O'Brien T, Larkin J, Horswell S, Stares M, Au L, Jamal-Hanjani M, Challacombe B, Chandra A, Hazell S, Eichler-Jonsson C, Soultati A, Chowdhury S, Rudman S, Lynch J, Fernando A, Stamp G, Nye E, Jabbar F, Spain L, Lall S, Guarch R, Falzon M, Proctor I, Pickering L, Gore M, Watkins TBK, Ward S, Stewart A, DiNatale R, Becerra MF, Reznik E, Hsieh JJ, Richmond TA, Mayhew GF, Hill SM, McNally CD, Jones C, Rosenbaum H, Stanislaw S, Burgess DL, Alexander NR, Swanton C; PEACE; TRACERx Renal Consortium. Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell*. 2018 Apr 19;173(3):581-594.e12. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.057. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29656895; PMCID: PMC5938365.
144. Volpe A, Novara G, Antonelli A, Bertini R, Billia M, Carmignani G, Cunico SC, Longo N, Martignoni G, Minervini A, Mirone V, Simonato A, Terrone C, Zattoni F, Ficarra V; Surveillance and Treatment Update on Renal Neoplasms (SATURN) Project; Leading Urological No-Profit Foundation for Advanced Research (LUNA) Foundation. Chromophobe renal cell carcinoma (RCC): oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series. *BJU Int*. 2012 Jul;110(1):76-83. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10690.x. Epub 2011 Nov 1. PMID: 22044519.
145. Wald NJ, Kennard A, Hackshaw AK. First trimester serum screening for Down's syndrome. *Prenat Diagn*. 1995 Dec;15(13):1227-40. doi: 10.1002/pd.1970151305. Erratum in: *Prenat Diagn* 1996 Apr;16(4):387. PMID: 8710764.
146. Wagener N, Edelmann D, Benner A, Zigeuner R, Borgmann H, Wolff I, Krabbe LM, Musquera M, Dell'Oglio P, Capitanio U, Klatter T, Cindolo L, May M, Brookman-May SD; European Association of Urology (EAU) Young Academic Urologists (YAU) Kidney Cancer Group. Outcome of papillary versus clear cell renal cell carcinoma varies significantly in non-metastatic disease. *PLoS One*. 2017 Sep 21;12(9):e0184173. doi: 10.1371/journal.pone.0184173. PMID: 28934212; PMCID: PMC5608215.



147. 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.
148. Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol.* 2018 Dec;36(12):1913-1926. doi: 10.1007/s00345-018-2447-8. Epub 2018 Aug 19. PMID: 30123932; PMCID: PMC6280811.
149. 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.
150. 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.
151. Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jürgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Löning SA, Frei U, Maher ER, Gröne HJ, Eckardt KU. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res.* 2001 Jul 1;61(13):5215-22. PMID: 11431362.
152. Wood EL, Adibi M, Qiao W, Brandt J, Zhang M, Tamboli P, Matin SF, Wood CG, Karam JA. Local Tumor Bed Recurrence Following Partial Nephrectomy in Patients with Small Renal Masses. *J Urol.* 2018 Feb;199(2):393-400. doi: 10.1016/j.juro.2017.09.072. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28941919.
153. Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K, Miura T, Moriyama M, Nagashima Y, Nakatani Y, Kubota Y, Kondo K. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Oct 16;94(20):1569-75. doi: 10.1093/jnci/94.20.1569. PMID: 12381710.
154. Yuen JS, Akkaya E, Wang Y, Takiguchi M, Peak S, Sullivan M, Protheroe AS, Macaulay VM. Validation of the type 1 insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in renal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2009 Jun;8(6):1448-59. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0101. Epub 2009 Jun 9. PMID: 19509240.

155. Zamparese R, Pannone G, Santoro A, Lo Muzio L, Corsi F, Pedicillo MC, Scillitani EL, Tortorella S, Staibano S, Piscuoglio S, Lo Russo L, Bufo P. Survivin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Invest.* 2008 Nov;26(9):929-35. doi: 10.1080/07357900802017553. PMID: 19034775.
156. 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.
157. Zhang L, Zha Z, Qu W, Zhao H, Yuan J, Feng Y, Wu B. Tumor necrosis as a prognostic variable for the clinical outcome in patients with renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2018 Sep 3;18(1):870. doi: 10.1186/s12885-018-4773-z. PMID: 30176824; PMCID: PMC6122538.
158. Zhang KJ, Wilson GD, Kara S, Majeske A, Zhang PL, Hafron JM. Diagnostic role of kidney injury molecule-1 in renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol.* 2019 Nov;51(11):1893-1902. doi: 10.1007/s11255-019-02231-0. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31385177.
159. 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.
160. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology.* 2004 Apr;63(4):651-5. doi: 10.1016/j.urology.2003.11.011. PMID: 15072872.
161. Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, Chao DH, Dorey F, Said JW, deKernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS. Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2002 Dec 1;20(23):4559-66. doi: 10.1200/JCO.2002.05.111. PMID: 12454113.

## 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.
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/anticancerres.13466. PMID: 31177175.

#### 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.
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.
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.
  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.

### **Publikace *in extenso* bez IF**

1. Matoušková M, Adámková V, **Čechová M**, Lahoda Brodská H. Konsenzuální postupy v léčbě močových infekcí. Praha: Solen, 2022.
2. **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.
3. **Čechová M**. Sexuální dysfunkce u mužů. In: Kříž J. et al. Poranění míchy. Příčiny, důsledky, organizace péče. Praha: Galén, 2019;209-223.
4. **Čechová M**, Matoušková M. Možnosti v léčbě močových infekcí v ordinaci praktického lékaře. *Med. praxi*. 2019;16(2):79-84.
5. Žemličková B, **Čechová M**. Benigní hyperplazie prostaty – aktuální možnosti farmakoterapie, rizika a limity spojené s léčbou. *Urol. praxi*. 2019;20(4):161-165.
6. 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.
7. 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.
8. **Čechová M**. Možnosti léčby infekcí močových cest v ordinaci praktického lékaře. *Practicus* 2018;7:22-25.
9. Nekula M, Babjuk M, Chmelová R, **Čechová M**. Vzácný případ eosinofilní funikulitidy. *Ces Urol*. 2018;22(2):126-130.

10. **Čechová M.** Léčba benigní hyperplazie prostaty z pohledu praktického lékaře. Med. praxi. 2018;15(2):66-70.
11. **Čechová M.**, Šturcová-Kaliská V, Matoušková M. Benigní hyperplazie prostaty – symptomatologie a léčba. Postgraduální medicína. 2017;6:638-643.
12. 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 spermiích. Ces Urol. 2016;20(4):317-325.
13. 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.
14. Chocholatý M, **Čechová M.** Rekonstrukční operace u lokalizovaného karcinomu penisu. Lékařské listy. 2014;10:5-6.
15. **Čechová M.**, Chocholatý M. Erektální dysfunkce. Postgraduální medicína. 2014;16(8):871-878.

## **10. PŘÍLOHY**

Manuskripty článků, které jsou podkladem disertace – viz kapitola 9.

Příloha č. 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.

Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2021 Dec; 165(4):375-379.

## Diagnostic and prognostic value of placental growth factor serum concentration in clear cell renal cell carcinoma

Marcela Cechova<sup>a</sup>, Matus Chocholaty<sup>a</sup>, Marek Babjuk<sup>a</sup>, Tomas Zima<sup>b</sup>, Klara Havlova<sup>a</sup>, Marketa Koldova<sup>a</sup>, Marek Schmidt<sup>a</sup>, Marta Kalousova<sup>a</sup>

**Background and Aim:** Placental Growth Factor (PlGF) plays a crucial role in angiogenesis and was identified as a potential prognostic biomarker in various types of cancer. Therefore, we evaluated the diagnostic accuracy and prognostic value of PlGF serum concentration in patients with clear cell renal cell carcinoma (ccRCC).

**Patients and Methods:** A total of 49 patients subjected to partial or radical nephrectomy for ccRCC [localized without relapse (lccRCC; n=31), localized with later relapse (rccRCC; n=8), primary metastatic cancer (mccRCC; n=10); median of follow-up 4.4 years] were enrolled in a prospective study to assess the significance of PlGF serum concentration. PlGF was measured prior to surgery and 3 months postoperatively. Our control group consisted of 38 healthy subjects.

**Results:** PlGF serum concentration was significantly higher in ccRCC compared to controls ( $P=0.002$ ). The cut-off value of PlGF concentration for the risk of ccRCC was determined at 12.71 pg/mL (AUC=0.729;  $P=0.0001$ ). Prior to surgery, among ccRCC subgroups, significantly higher PlGF concentration was detected in mccRCC compared to lccRCC ( $P=0.002$ ). Postoperatively, we observed a tendency to higher PlGF serum concentration in rccRCC compared to lccRCC subgroup, however without significance ( $P=0.17$ ). The cut-off value for the risk of relapse was 11.41 pg/mL (AUC=0.792;  $P=0.0003$ ). In subjects with localized ccRCC with PlGF concentration below 11.41 pg/mL 3-years cancer specific survival was 93% compared to 61% in subject with concentration above the cut-off value ( $P=0.018$ ).

**Conclusion:** Based on our findings, PlGF serum concentration seems to be a useful biomarker in diagnostics and prediction of prognosis in ccRCC.

**Key words:** placental growth factor, PlGF, clear cell renal cell carcinoma, biomarker, diagnosis, prognosis

Received: May 1, 2020; Revised: November 9, 2020; Accepted: January 8, 2021; Available online: February 22, 2021  
<https://doi.org/10.5507/bp.2021.003>

© 2021 The Authors; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

<sup>a</sup>Department of Urology, University Hospital Motol and 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic  
<sup>b</sup>Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital and 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Corresponding author: Marta Kalousova, e-mail: [marta.kalousova@f1.cuni.cz](mailto:marta.kalousova@f1.cuni.cz)

### INTRODUCTION

Worldwide, renal cell carcinoma (RCC) is the sixth most frequently diagnosed cancer in men and eighth in women, accounting for 5% respectively 3% of all carcinomas with the highest incidence in the Western countries<sup>1</sup>. In 2018 in Europe new cases of RCC were estimated to occur in 136,500 patients resulting in 54,700 deaths<sup>2</sup>.

Although most detected RCCs are incidentally diagnosed small tumours, locally advanced disease is still found in a significant proportion of patients with up to one third presenting with distant metastasis at the time of diagnosis<sup>3</sup>. Moreover, about 20-40% patients experience recurrence after surgical treatment of localized disease<sup>4</sup>. The introduction of targeted agents has considerably improved the prognosis of patients with metastatic disease, yet, median survival is beyond two years<sup>5</sup>.

Despite improvements in diagnostics and treatment, RCC still remains among urological malignancy with the highest mortality. Although several risk models for prediction of recurrence have been introduced, the individual course of diseases is difficult to predict. Biomarkers can improve the diagnostics of RCC, and even more can pro-

vide additional predictive accuracy in identifying patients with higher risk of recurrence which would enable treatment individualization and improvement of patients' prognosis. Therefore, investigation of potential biomarkers is needed.

Cancer-related angiogenesis is crucial for tumour growth and progression, and it is regulated by various tumour cell produced growth factors<sup>6</sup>. Placental growth factor (PlGF) belongs to vascular endothelial growth factor (VEGF) family, which is the most important trigger of angiogenesis and endothelial cell growth. PlGF stimulates angiogenesis specifically targeting VEGF receptor 1 (Flt-1) and co-receptor neuropilin (NRP1). Originally PlGF was described in human placenta and it is highly expressed throughout pregnancy<sup>7</sup>. In healthy subjects PlGF serum levels are typically low but increase under pathological conditions such as ischemia, inflammation or tumour growth<sup>8,9</sup>. Overexpression of PlGF has been described in several types of carcinomas. Furthermore, PlGF was identified as a potential prognostic biomarker of cancer progression as its higher expression correlates with advanced tumour stage, hypervascularity, presence of metastasis and shorter patient survival<sup>10-15</sup>. However, there

is only a limited number of studies assessing the role and significance of PIGF in RCC (ref.<sup>16,17</sup>).

The present study aimed to evaluate PIGF serum concentration in patients suffering from clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), and furthermore, to explore its diagnostic accuracy and prognostic value.

## PATIENTS AND METHODS

### Subjects

Into this prospective study we included 49 individuals (30 men, 19 women, mean age  $62.9 \pm 10.6$  years) who were subjected to radical or partial nephrectomy due to ccRCC from June 2011 to June 2013. In all resected tumour specimens negative surgical margins were described. For further comparison ccRCC subjects were classified in three subgroups: subjects with localized ccRCC without further relapse (lccRCC,  $n=31$ ), subjects with localized ccRCC with relapse 6 to 18 months following surgical treatment (rccRCC,  $n=8$ ) and subjects with primary metastatic carcinoma (mccRCC,  $n=10$ ). The staging of ccRCC was performed following the 2009 TNM classification system, Fuhrman Nuclear Grading System was used for evaluation of the tumour grade. Surveillance after partial or radical nephrectomy was performed in adherence to the EAU Guidelines for Renal Cell Carcinoma<sup>8</sup>. Median of follow-up of our study group was 4.4 years. During the follow-up relapse occurred in 8 subjects (rccRCC subgroup) and 17 subjects died. Table 1 describes demographic and clinicopathological parameters of ccRCC cases.

Thirty-eight matched for age and sex healthy subjects with no history of any malignant disease formed the control group. In all, basic uro-oncological screening including ultrasound, urine cytology and measurement of PSA levels in men was performed.

The study was conducted in adherence to ethical guidelines and approved by the institutional review board and ethics committee. A written informed consent was obtained from all participants prior to entering the study.

### Blood samples

In all individuals PIGF serum concentration was measured prior to surgical treatment. 3 months postoperatively blood samples were collected from patients with localized disease (lccRCC and rccRCC subgroups). Blood samples were obtained after overnight fast by puncture *via* cubital vein, at the same time with blood collection for routine control examinations. For PIGF analysis blood was centrifuged for 10 min at 3000 rpm and serum was stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

### Biomarker analysis

PIGF serum concentration was assessed with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using standard kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the manufacturers' instructions. Results are expressed in picograms per millilitre (pg/mL).

### Statistical analysis

Data are presented as the means  $\pm$  standard deviation (SD) for continuous variables and percentages for categorical variables. For continuous variables the difference between subgroups was analysed by one-way ANOVA or Mann-Whitney U test, as appropriate. The repeated measures ANOVA test was used for the analysis of continuous variables over time. The Receiver Operating Characteristics (ROC) curves were created and relative potential of PIGF to identify ccRCC was specified with calculation of area under the ROC curve (AUC). Kaplan-Meier method was used for survival analysis and log-rank test was performed to compare survival between subgroups. Univariate Cox proportional hazards regression analyses were applied for assessment of PIGF serum concentration as a potential predictor of cancer specific and overall survival. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Data analyses were carried out using MedCalc for Windows, version 13.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

## RESULTS

### Diagnostic accuracy of PIGF in ccRCC

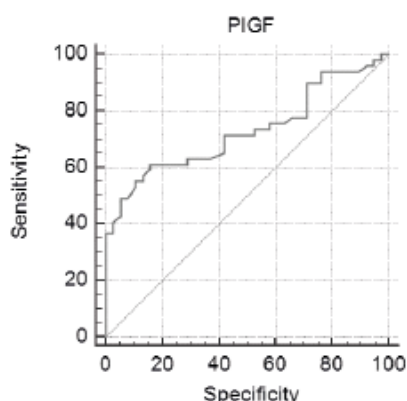
PIGF serum concentration in ccRCC subjects ( $16.1 \pm 10.5$  pg/mL) was significantly higher compared to healthy controls ( $10.5 \pm 2.4$  pg/mL) ( $P=0.002$ ). The cut-off value of PIGF serum concentration for the risk of ccRCC was determined at 12.71 pg/mL with AUC 0.729, providing the specificity of 84.21% and sensitivity of 61.22% ( $P=0.0001$ ) (Fig 1). Prior to surgical treatment, a significant difference in PIGF serum concentration was found between lccRCC ( $13.1 \pm 5.1$  pg/mL) and mccRCC ( $25.8 \pm 18.1$  pg/mL) subgroups ( $P=0.002$ ). However, we found no statistically significant difference between rccRCC ( $15.9 \pm 6.9$  pg/mL) and lccRCC or mccRCC subgroups, respectively. PIGF serum concentration was not found to correlate with tumour stage (T1-T2 vs T3-T4,  $P=0.76$ ) or Fuhrman's grade (G1-G2 vs G3-G4,  $P=0.07$ ).

Table 1. Parameters of ccRCC patients.

Number of patients (men/women)	49 (30/19)
Age (years)	$62.9 \pm 10.6$
Stage	
I	23 (46.9%)
II	1 (2%)
III	15 (30.6%)
IV	10 (20.4%)
Grade	
G1	10 (20.4%)
G2	31 (63.3%)
G3	5 (10.2%)
G4	3 (6.1%)

ccRCC: clear cell renal cell carcinoma

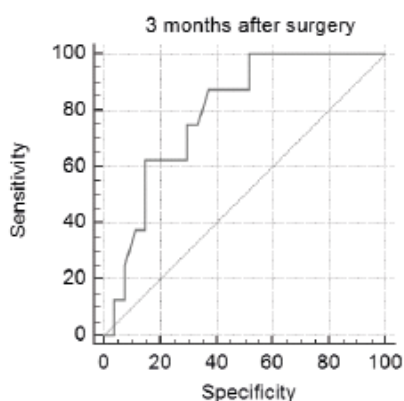




**Fig. 1.** Cut-off value of PIGF serum concentration for the risk of ccRCC.

Cut-off value of PIGF serum concentration for the risk of ccRCC >12.71 pg/mL (AUC 0.729, specificity 84.21%, sensitivity 61.22%,  $P=0.0001$ ).

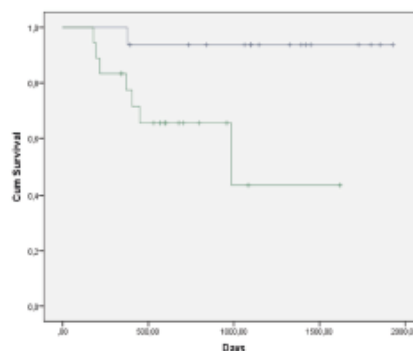
PIGF: placental growth factor, ccRCC: clear cell renal cell carcinoma, AUC: area under the curve



**Fig. 2.** Cut-off value of PIGF serum concentration for the risk of ccRCC recurrence.

Cut-off value of PIGF serum concentration for the risk of ccRCC recurrence >11.41 pg/mL (AUC 0.792, specificity 62.96%, sensitivity 87.5%,  $P=0.0003$ ).

PLGF: placental growth factor, ccRCC: clear cell renal cell carcinoma, AUC: area under the curve



**Fig. 3.** Kaplan-Meier curves of 3-years cancer specific survival (CSS).

Kaplan-Meier curves of 3-years cancer specific survival (CSS). Upper line – patients with PIGF serum concentration <11.41 pg/mL 3-years CSS 93%, lower line – patients with PIGF serum concentration >11.41 pg/ml 3-years CSS 61%.

PIGF: placental growth factor, CSS: cancer specific survival.

#### Prognostic value of PIGF in ccRCC

Three months postoperatively, higher PIGF serum concentration in recRCC ( $14.87 \pm 2.96$  pg/mL) compared to locRCC ( $12.1 \pm 5.4$  pg/mL) subgroup was found, but the difference was not statistically significant ( $P=0.17$ ). Table 2 depicts all PIGF serum concentrations.

However, the cut-off value for the risk of relapse was determined at 11.41 pg/mL with AUC 0.792, providing the specificity of 62.96% and sensitivity of 87.5% ( $P=0.0003$ ) (Fig 2).

3-years cancer specific survival in localized ccRCC subjects (locRCC and recRCC subgroup) with PIGF serum concentration below the cut-off (<11.41 pg/mL) was 93% compared to 61% in subjects with PIGF serum concentration above the established cut-off for the risk of relapse (>11.41 pg/mL) (HR 7.9967, CI 1.9938 to 32.0733,  $P=0.018$ ) (Fig 3).

#### DISCUSSION

Angiogenesis is essential for tumour growth and is assumed to be a key factor of cancer progression and development of metastasis<sup>4</sup>. Among various angiogenic factors VEGF is the most powerful and has been extensively studied over the last years. PIGF is a member of VEGF family and its overexpression is associated predominantly with pathological angiogenesis. Increased PIGF concentrations have been described in several conditions including carcinogenesis. Additionally, several studies imply that higher circulating levels of PIGF correlate with cancer aggressiveness. Therefore, PIGF was identified to be a prognostic marker of cancer progression of many

Table 2. PIGF serum concentrations

PIGF (pg/mL)	ccRCC			Controls	P
Preoperative	16.1±10.5			10.5±2.4	P=0.002
	Subgroups of ccRCC				
	locRCC	recRCC	mccRCC		
Preoperative	13.1±5.1	15.9±6.9	25.8±18.1	—	locRCC vs mccRCC P=0.002*
3 months after surgery	12.1±5.4	14.87±2.96	—	—	P=0.17

\*Preoperatively, PIGF serum concentration significantly higher in mccRCC compared to locRCC (P=0.002). No statistically significant difference between locRCC vs recRCC and recRCC vs mccRCC.

PIGF: placental growth factor, ccRCC: clear cell renal cell carcinoma, locRCC: localized ccRCC without further relapse, recRCC: localized ccRCC with later relapse, mccRCC: metastatic ccRCC.

tumours including breast, ovarian, gastric, colorectal, hepatocellular, lung carcinoma or malignant pleural mesothelioma<sup>10-15,19,22</sup>.

Although the role of PIGF in diagnostics and estimation of prognosis has been studied in various tumours, little is known regarding this angiogenic factor in RCC. Since, hypervascularization is a common feature among various solid tumours as well as RCC, production of angiogenic factors in kidney cancer cells have been presumed. Takahashi et al. (ref.<sup>16</sup>) as first proved elevated expression of VEGF and PIGF in hypervascular RCC tissue with no detection of PIGF in normal kidney tissue. Matsumoto et al. (ref.<sup>7</sup>) analysed PIGF serum levels and its correlation with clinical features of RCC and described association between PIGF concentration and histological grade and tumour vascularity. Furthermore, proposed a prognostic significance of PIGF in RCC.

The aim of the present study was to explore the significance of PIGF serum concentration in patients with ccRCC, the predominant histological subtype of RCC. In the first place, we evaluated the diagnostic significance of PIGF serum concentration. Consistent with previous studies we confirmed significantly higher PIGF serum concentration in ccRCC patients compared to healthy controls. The cut-off value for PIGF serum concentration for the risk of ccRCC was established at 12.71 pg/mL, reaching the specificity of 84.21% and sensitivity of 61.22% with AUC 0.729. Based on our results, PIGF serum concentration can be considered as a diagnostic biomarker for detection of ccRCC. However, with respect to AUC most probably as a component of multi-marker diagnostic test rather than a single-marker test.

In our study group PIGF serum concentration was not found to correlate with tumour stage and Fuhrman's grade. Although, a trend towards higher PIGF serum concentration was observed in ccRCC with more aggressive grade, the results were not significant (G1-G2 vs G3-G4, P=0.07). This could be explained by the small number of patients and a higher proportion of lower stage and grade tumours.

Secondly, we assessed the potential value of PIGF serum concentration in prediction of relapse and prognosis in patients with localized disease. Postoperatively, we observed a tendency to higher PIGF serum concentration in recRCC compared to locRCC. The cut-off value of PIGF serum concentration for the risk of relapse was determined at 11.41 pg/mL and provided the specificity of

62.96% and sensitivity of 87.5% with AUC 0.792. 3-years cancer specific survival in patients with localized disease with PIGF serum concentration below this cut-off was 93% compared to only to 61% with concentration above the cut-off. According to these findings we presume PIGF serum concentration can be useful in identifying patients with higher risk of recurrence. Even more, PIGF serum concentration can be considered as a potential prognostic biomarker in ccRCC.

Based on previously published studies we assumed higher PIGF serum concentrations in ccRCC patients compared to healthy individuals. Still, the primary goal of our study was to assess whether higher serum concentrations are of clinical importance in diagnosis and estimation of prognosis in ccRCC. Therefore, we did not examine expression of PIGF in tumour tissue. Main limit of our study was a small number of patients in each subgroup. PIGF was shown to have a significant position in gynaecological non-oncological testing (early evaluation of the risk of pre-eclampsia in pregnant women), resulting in broadening and availability of diagnostic technologies of the marker. Combined with the fact, that ccRCC does not have a suitable biomarker, PIGF could, based on our results, show to be a promising one. Though, further studies on larger patient cohorts are necessary to confirm this premise.

## CONCLUSION

We can conclude that PIGF can be a useful biomarker in diagnostics and prediction of prognosis in subjects with ccRCC. Our results show higher PIGF serum concentration in ccRCC patients compared to healthy controls with the cut-off value for the risk of ccRCC at 12.71 pg/mL. Concomitantly PIGF seems to be a predictor of relapse and prognosis in patients with localized disease with the cut-off value at 11.41 pg/mL. In these patients with PIGF serum level below the cut-off, 3-years cancer specific survival was 93% in comparison to 61% for those with level above the cut-off.

**Acknowledgements:** Results of the study were presented at EAU 17th Central European Meeting in Plzeň, Czech Republic, 2017. Abstract named "Placental growth factor – a biomarker for diagnosis, follow-up and prognosis in renal cell cancer" by authors Chocholatý M, Cechová M,

Babjuk M, Havlova K, Koldova M, Schmidt M, Kalousova M and Zima T is available at *Eur Urol Suppl* 2017; 16: e2845. The present study was supported by research grants MH CZ – DRO VFN 64165, Progres Q25 and MH CZ 00064203. For technical support the authors are grateful to Mrs. Dita Hudcová, Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Prague, Czech Republic.

**Author contributions:** MC: sample and clinical data collection, data analysis, manuscript writing; MCh: sample and clinical data collection, conceptualization, formal and statistical analysis, critical reading and review of the manuscript; MB: expert opinion and supervision of the clinical part of the study, data interpretation, critical reading and review of the manuscript; TZ: expert opinion and supervision of the laboratory part of the study, data interpretation, critical reading and review of the manuscript; KH, MKo, MS: sample and clinical data collection; MKa: study design, biochemical analysis, data interpretation, critical reading and review of the manuscript.

**Conflicts of interest statement:** The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

## REFERENCES

- Capitaino 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;75(1):74-84.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 2018;103:356-387.
- Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW, Charbonneau C. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treat Rev* 2008;34(3):193-205.
- Speed JM, Trinh QD, Choueiri TK, Sun M. Recurrence in Localized Renal Cell Carcinoma: a Systematic Review of Contemporary Data. *Curr Urol Rep* 2017;18(2):15.
- Gore ME, Larkin JM. Challenges and opportunities for converting renal cell carcinoma into a chronic disease with targeted therapies. *B J Cancer* 2011;104(3):399-406.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438(7070):932-6.
- 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;88(20):9267-71.
- Autiero M, Lutun 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.
- 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;8(12):942-56.
- 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;41(18):2819-27.
- 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.
- 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;213(1):73-82.
- Wei SC, Tsao PN, Yu SC, Shun CT, Tzai-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;54(5):666-72.
- 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;250(2):237-49.
- Soukup V, Čapoun O, Peřil M, Sobotka R, Vívřivřil L, Hanuš T, Zima T, Kalousova M. Placental Growth Factor in Bladder Cancer Compared to the Diagnostic Accuracy and Prognostic Performance of Vascular Endothelial Growth Factor A. *Anticancer Res* 2018;38(1):239-246.
- 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;54(15):4233-7.
- 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;23(6D):4953-8.
- Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, Mulders P, Powles T, Staehler M, Volpe A, Bex A. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol* 2015;67(5):913-24.
- Escudero-Esparza A, Martin TA, Davies ML, Jiang WG. PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2, in colorectal cancer and the prognostic significance. *Cancer Genomics Proteomics* 2009;6(4):239-46.
- 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;244(4):291-96.
- 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;3:68.
- 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;88(2):426-31.

Příloha č. 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/anticancerres.13466. PMID: 31177175.

ANTICANCER RESEARCH 39: 3249-3253 (2019)  
doi:10.21873/anticancerres.13466

## The Significance of Pregnancy-associated Plasma Protein a Serum Concentration in Clear Cell Renal Cell Carcinoma

MARCELA CECHOVA<sup>1</sup>, MATUS CHOCHOLATY<sup>1</sup>, TOMAS ZIMA<sup>2</sup>,  
MAREK BABJUK<sup>1</sup> and MARTA KALOUSOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, University Hospital Motol, 2nd Faculty of Medicine,  
Charles University, Prague, Czech Republic;

<sup>2</sup>Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics,  
General University Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

**Abstract.** *Background/Aim: Proteinase pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) modulates the cell growth and carcinogenesis process. Its role in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) remains unclear. This study aimed to evaluate the significance of PAPP-A serum concentration in diagnosis, follow-up and prognosis of ccRCC patients. Materials and Methods: In a prospective study including 121 patients who underwent radical or partial nephrectomy for ccRCC [localized ccRCC without relapse (n=80), localized ccRCC with later relapse (n=26), primary metastatic cancer (n=15)] PAPP-A serum concentration was assessed preoperatively and in certain subgroups also postoperatively. Results: PAPP-A serum concentration showed no statistically significant difference between ccRCC and controls and among ccRCC subgroups, respectively. Disease stage and Fuhrman's grade were not shown to affect PAPP-A concentration. The dynamics of postoperative PAPP-A concentrations did not reveal any significance and PAPP-A was not a prognostic factor for cancer related or overall survival. Conclusion: PAPP-A serum concentration does not seem to be a useful biomarker in ccRCC.*

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 2-3% of all adult malignancies presenting the highest incidence in the Western world (1). Incidence of RCC has been continuously increasing over the last years. Clear cell RCC (ccRCC) represents the most prevalent histopathological subtype,

*Correspondence to:* Prof. Marta Kalousova, MD, Ph.D., Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, 12808 Prague 2, U Nemocnice 2, Czech Republic. Tel: +420 224964212, e-mail: marta.kalousova@lf1.cuni.cz

*Key Words:* Pregnancy-associated plasma protein A, PAPP-A, clear cell renal cell carcinoma, diagnosis, prognosis.

which is diagnosed in more than 80% of patients. The exact process of the formation and progression of ccRCC is not known. There are no recommended genetic or biochemical markers for diagnosis and prediction of relapse before surgical removal of the tumour or during follow-up.

Despite advances in diagnosis, especially in imaging techniques and higher rates of incidentally diagnosed tumours with imaging for unrelated complaints, still, in up to 30% of patient's, distant metastases are present at the time of initial diagnosis (2, 3). Furthermore, recurrence occurs in 20-30% patients with an initially localized disease during the follow-up (4). RCC is potentially curative with surgery and it is generally resistant to chemotherapy and radiotherapy. Despite progress in targeted therapy, prognosis of metastatic RCC remains poor with median survival less than one year (3). Therefore, detection of a biomarker suitable for early diagnosis and, even more, for accurate determination of the risk of relapse after partial or radical nephrectomy is of great importance.

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A), also referred to as pappalysine-1 is a proteolytic enzyme that belongs to the zinc metalloproteinase superfamily. PAPP-A increases bioavailability of insulin like growth factor I (IGF-1) for receptor activation via proteolysis of inhibitory IGF binding proteins (IGFBPs), in particular IGFBP-4. Targeting IGF-1 receptor (IGF-1R) IGF-1 affects proteosynthesis (5). PAPP-A is expressed predominantly during pregnancy in placental syncytiotrophoblast and is required for normal foetal development and growth. Routinely, measurement of serum concentration of PAPP-A applies as a screening method for Down syndrome in the first trimester of gestation.

However, despite during pregnancy, PAPP-A is also expressed by multiple tissues and has an important role in processes like wound healing, vascular repair or bone remodelling. The involvement of the proteolytic effect of PAPP-A in the process of carcinogenesis is highly suggested

and has been extensively studied in the past years. So far, increased serum concentration of PAPP-A has been described in lung and ovarian cancer and even more, overexpression of PAPP-A has been shown to promote cancer growth and increase cancer aggressiveness in breast and ovarian cancer (6-9).

The role of PAPP-A in RCC remains unclear. The present study aimed to assess PAPP-A serum concentration in subjects suffering from ccRCC and to evaluate its significance in diagnosis, follow-up and assessment of prognosis, which has not been evaluated yet.

**Materials and Methods**

*Characteristics of study population.* In our study we enrolled 121 patients (78 men, 43 women, mean age 63.4±10.52 years) that were subjected to radical or partial nephrectomy due to ccRCC from July 2011 to August 2015. Negative surgical margins on histopathological specimens of resected tumours were described in all individuals. ccRCC patients were classified into three subgroups: subjects with localized ccRCC without relapse (lccRCC, n=80), subjects with localized ccRCC with later relapse (rccRCC, n=26) and subjects with primary metastatic cancer (mccRCC, n=15). Staging was performed according to the 2009 TNM classification system and Fuhrman classification was used to define the nuclear grade. Surveillance following surgical treatment was performed according to the EAU Guidelines for Renal Cell Carcinoma (10). Median follow-up was 4.6 years. The parameters of the subjects with ccRCC are shown in Table I.

PAPP-A serum concentration was assessed in all individuals preoperatively and in lccRCC (n=23 patients) and rccRCC (n=14 patients) subgroups 3 weeks and 3 months postoperatively.

The control group consisted of 69 healthy subjects (35 men, 34 women, mean age 58.13±4.7 years), who underwent basic uro-oncological screening including ultrasound, urine cytology and measurement of PSA levels in men. None of them had a history of any oncological disease.

The present study was performed in adherence to the principles stated in the Helsinki Declaration and approved by the institutional review board and ethics committee. Prior to entering the study, all participants gave their informed consent.

PAPP-A serum concentration was assessed by TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) using standard kits and Kryptor analyzer (Brahms GmbH, Thermo Fisher Scientific, Henningsdorf, Germany). Results are expressed in mIU/l. One IU/l is equivalent to 4500 ng/ml (11).

*Statistical analysis.* All data are expressed as the mean±standard deviation (SD) for continuous variables and percentages for categorical variables. For continuous variables, the difference between two groups was analysed by the Mann-Whitney *U*-test or one-way ANOVA test, as appropriate. For the analysis of continuous variables over time, the repeated measures ANOVA test was used. Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method. To compare survival between patient groups or subgroups the log-rank test was applied. Univariate Cox proportional hazards regression analyses were used to evaluate PAPP-A as a potential predictor of overall (OS) and cancer specific survival (CSS). At *p*<0.05 results were considered statistically significant. All

Table I. Clinical parameters of ccRCC cases

Number of patients (men/women)	121 (78/43)
Age (years)	63.4±10.52
Stage	
I	78 (64.4%)
II	4 (3.3%)
III	24 (19.8%)
IV	15 (12.4%)
Grade	
1	36 (29.8%)
2	59 (48.8%)
3	18 (14.9%)
4	8 (6.6%)

Table II. PAPP-A serum concentrations

PAPP-A serum concentration (mIU/l)	RCC patients			Controls
	lccRCC	rccRCC	mccRCC	
Preoperative	8.76±3.7	8.72±3.1	8.7±3.4	8.24±2.3
3 weeks after surgery	9.08±3.5	8.27±3.2		
3 months after surgery	9.39±3.8	9.33±3.1		

Results are not statistically significant.

statistical analyses were performed using MedCalc (version 13, Ostend, Belgium).

**Results**

Our results did not show any statistically significant difference in PAPP-A serum concentration between subjects with ccRCC (8.74±3.5 mIU/l) and control group (8.24±2.3 mIU/l), *p*=0.24. In addition, no statistically significant difference among lccRCC (8.76±3.7 mIU/l), rccRCC (8.72±3.1 mIU/l) and mccRCC (8.7±3.4 mIU/l) subgroups was found (*p*=0.99). Furthermore, no statistically significant difference in PAPP-A serum concentration was observed even after subdivision of subjects based on tumour stage and Fuhrman's grade (*p*=0.76, *p*=0.61). The dynamics of PAPP-A concentrations at 3 weeks and 3 months postoperatively did not reveal any significant difference in lccRCC (9.08±3.5 vs 9.39±3.8 mIU/l, *p*=1.00) or rccRCC (8.27±3.2 vs 9.33±3.1 mIU/l, *p*=0.43) subgroups. PAPP-A serum concentrations are depicted in Table II.

The median value of PAPP-A serum concentration was used in the survival analysis. Preoperatively, the median was 8.2 mIU/l and 3 months after the surgery was 9.2 mIU/l. Preoperative and 3 months after surgery PAPP-A serum concentration was not a prognostic factor for CSS or OS (Table III).

subdivision of ccRCC subjects (lccRCC, rccRCC and mcRCC) did not reach statistical significance. In addition, no statistically significant difference in PAPP-A serum concentration was found even after subdivision of subjects based on tumour stage and Fuhrman's grade. The dynamics of PAPP-A postoperative concentrations didn't reveal any significance and no impact on cancer related or overall survival was observed.

Based on the current results, PAPP-A serum concentration does not seem to be a useful biomarker for diagnosis, follow-up or prediction of prognosis in subjects suffering from ccRCC. Therefore, further research must be done to identify a suitable biomarker for ccRCC. An abundance of potential biomarkers can be found in the literature, yet none has been introduced into routine practice. Until now, no suitable biomarker has been found for the early diagnosis and follow-up of RCC that would have a potential of commercial development and extensive use; this remains the task of further studies.

In conclusion, the significance of PAPP-A serum concentration was evaluated in patients with ccRCC. Although, the role of PAPP-A in carcinogenesis of various tumours has been examined, to the best of our knowledge, our current work assesses for the first time the association between PAPP-A serum concentration and ccRCC. Although PAPP-A appears to be a promising marker for many tumours, our results did not show any significance of PAPP-A serum concentration in subjects with ccRCC in comparison to the control group. In addition, the dynamics of postoperative PAPP-A serum concentration showed no statistical significance. Therefore, PAPP-A does not seem to be a useful biomarker for diagnosis, follow-up and prediction of prognosis in subjects suffering from ccRCC.

#### Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest with respect to the research, authorship and publication of this article exist.

#### Authors' Contributions

Marcela Cechova, MD has contributed with conceptualization, data curation, formal analysis, project administration, writing - original draft. Matus Chocholaty, MD, PhD has contributed with conceptualization, data curation, formal and statistical analysis, project administration, validation and writing - review and editing. Prof. Tomas Zima, MD, PhD has contributed with supervision of the laboratory part of the study, writing - review and editing. Prof. Marek Babjuk, MD, PhD has contributed with supervision of the clinical part of the study, writing - review and editing. Prof. Marta Kalousova, MD, PhD has contributed with conceptualization, methodology, data analysis, supervision, validation and writing - review and editing.

#### Acknowledgements

Results of this study were presented at EAU 17th Central European Meeting in Plzeň, Czech Republic, 2017. Abstract entitled

"Determination of serum level of PAPP-A in patients with clear cell renal cell carcinoma" is available at *Eur Urol Suppl* 16: e2842, 2017. This study was supported by research projects MH CZ – DRO VFN 64165 and Progres Q25. The Authors are thankful to Mrs. Dita Hudcová from the Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Prague, Czech Republic for technical assistance in the study.

#### References

- Capitaino U, Bensalah K, Bex A, Boorjian SA, Bray F, Coleman J, Gore JL, Sun M, Wood C and Russo P: Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 75: 74-84, 2019. PMID: 30243799. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.08.036
- Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68: 7-30, 2018. PMID: 29313949. DOI: 10.3322/caac.21442
- Gupta K, Miller JD, Li JZ, Russell MW and Charbonneau C: Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review. *Cancer Treat Rev* 34: 193-205, 2008. PMID: 18313224. DOI: 10.1016/j.ctrv.2007.12.001
- Athar U and Gentile TC: Treatment options for metastatic renal cell carcinoma: a review. *Can J Urol* 15: 3954-3966, 2008. PMID: 18405442.
- Conover CA: Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. *Trends Endocrinol Metab* 23: 242-249, 2012. PMID: 22463950. DOI: 10.1016/j.jem.2012.02.008
- Bulut I, Coskun A, Ciftci A, Cetinkaya E, Altıay G, Caglar T and Gukan E: Relationship between pregnancy-associated plasma protein-A and lung cancer. *Am J Med Sci* 337: 241-244, 2009. PMID: 19365167. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e31818967a3
- Alexiadis M, Marners P, Chu S and 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* 16: 1973-1979, 2006. PMID: 17177834. DOI: 10.1111/j.1525-1438.2006.00724.x
- Mansfield AS, Visscher DW, Hart SN, Wang C, Goetz MP, Oxvig C and Conover CA: Pregnancy-associated plasma protein-A expression in human breast cancer. *Growth Horm IGF Res* 24: 264-267, 2014. PMID: 25468445. DOI: 10.1016/j.jghir.2014.10.007
- Boldt HB and Conover CA: Overexpression of pregnancy-associated plasma protein-A in ovarian cancer cells promotes tumor growth *in vivo*. *Endocrinology* 152: 1470-1478, 2011. PMID: 21303951. DOI: 10.1210/en.2010-1095
- Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, Mulders P, Powles T, Staehler M, Volpe A and Bex A: EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol* 67: 913-924, 2015. PMID: 25616710. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.01.005
- Kalousová M, Dušilová-Sulková S, Kuběna AA, Zakiyanov O, Levová K, Bocková M, Gedeonová E, Song XC, Ermini ML, Špringer T, Homola J, Tesař V and Zima T: Pregnancy-associated plasma protein A2 in hemodialysis patients: significance for prognosis. *Kidney Blood Press Res* 42: 509-518, 2017. PMID: 28854436. DOI: 10.1159/000479847
- Seccareccia E and Brodt P: The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. *Growth Horm IGF Res* 22: 193-199, 2012. PMID: 23098677. DOI: 10.1016/j.jghir.2012.09.003

- 13 Weroha SJ and Haluska P: The insulin-like growth factor system in cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 41: 335-350, 2012. PMID: 22682634. DOI: 10.1016/j.ec1.2012.04.014
- 14 Samani AA, Yakar S, LeRoith D and Brodt P: The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 28: 20-47, 2007. PMID: 16931767. DOI: 10.1210/er.2006-0001
- 15 Belfiore A and Frasca F: IGF and insulin receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 381-406, 2008. PMID: 19016312. DOI: 10.1007/s10911-008-9099-z
- 16 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 and 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* 149: 461-471, 2008. PMID: 18838726.
- 17 Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK and 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* 11: 530-542, 2010. PMID: 20472501. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70095-4
- 18 Pollak M: The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer* 12: 159-169, 2012. PMID: 22337149. DOI: 10.1038/nrc3215
- 19 Tracz AF, Szczylak C, Porta C and Czarnecka AM: Insulin-like growth factor-1 signaling in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 16: 453, 2016. PMID: 27405474. DOI: 10.1186/s12885-016-2437-4
- 20 Tao Y, Pinzi V, Bourhis J and Deutsch E: Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway – therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4: 591-602, 2010. PMID: 17898809. DOI: 10.1038/ncponc0934
- 21 Parker AS, Cheville JC, Jamney CA and 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* 33: 801-805, 2002. PMID: 12203212.
- 22 Ahmad N, Keehn CA and Coppola D: The expression of insulin-like growth factor-I receptor correlates with Fuhrman grading of renal cell carcinomas. *Hum Pathol* 35: 1132-1136, 2004. PMID: 15343516.
- 23 Yuen JS, Akkaya E, Wang Y, Takiguchi M, Peak S, Sullivan M, Protheroe AS and Macaulay VM: Validation of the type 1 insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in renal cancer. *Mol Cancer Ther* 8: 1448-1459, 2009. PMID: 19509240. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0101
- 24 Pan H, Hanada S, Zhao J, Mao L and Ma MZ: Protein secretion is required for pregnancy-associated plasma protein-A to promote lung cancer growth *in vivo*. *PLoS One* 7: e48799, 2012. PMID: 23152806. DOI: 10.1371/journal.pone.0048799
- 25 Mikkelsen JH, Resch ZT, Kalra B, Savjani G, Kumar A, Conover CA and Oxvig C: Indirect targeting of IGF receptor signaling *in vivo* by substrate-selective inhibition of PAPP-A proteolytic activity. *Oncotarget* 5: 1014-1025, 2014. PMID: 24572990. DOI: 10.18632/oncotarget.1629
- 26 Becker MA, Haluska P Jr, Bale LK, Oxvig C and Conover CA: A novel neutralizing antibody targeting pregnancy-associated plasma protein-a inhibits ovarian cancer growth and ascites accumulation in patient mouse tumors. *Mol Cancer Ther* 14: 973-981, 2015. PMID: 25695953. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0880
- 27 Thomsen J, Hjortebjerg R, Espelund U, Ørtoft G, Vestergaard P, Magnusson NE, Conover CA, Tramm T, Hager H, Høgdall C, Høgdall E, Oxvig C and Frystyk J: PAPP-A proteolytic activity enhances IGF bioactivity in ascites from women with ovarian carcinoma. *Oncotarget* 6: 32266-32278, 2015. PMID: 26336825. DOI: 10.18632/oncotarget.5010
- 28 Conover CA, Bale LK, Mader JR, Mason MA and Keenan KP: Longevity and age-related pathology of mice deficient in pregnancy-associated plasma protein-A. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65: 590-599, 2010. PMID: 20351075. DOI: 10.1093/gerona/gdq032
- 29 Huang J, Tabata S, Kakiuchi S, The Van T, Goto H, Hanibuchi M and Nishioka Y: Identification of pregnancy-associated plasma protein A as a migration-promoting gene in malignant pleural mesothelioma cells: a potential therapeutic target. *Oncotarget* 4: 1172-1184, 2013. PMID: 23896451. DOI: 10.18632/oncotarget.1126
- 30 Prithviraj P, Anaka M, McKeown SJ, Permezel M, Walkiewicz M, Cebon J, Behren A and Jayachandran A: Pregnancy associated plasma protein-A links pregnancy and melanoma progression by promoting cellular migration and invasion. *Oncotarget* 6: 15953-15965, 2015. PMID: 25940796. DOI: 10.18632/oncotarget.3643

Received May 8, 2019

Revised May 24, 2019

Accepted May 24, 2019