

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Katedra experimentální chirurgie

Lubomír Hyrš

**Exprese CA IX antigenu u urogenitálních
nádorů, zejména se zaměřením na karcinom
ledviny a uroteliální tumory dolních
močových cest.**

Disertační práce

Praha 2012

Obsah

OBSAH	1
ÚVOD	3
1. LITERÁRNÍ ÚVOD A P ĚHLED DANÉ PROBLEMATIKY	3
1.1. Karcinom ledviny.....	10
1.2. Uroteliální nádory mo ůvých cest	12
2. CÍLE PRÁCE	14
3. SOUBOR A METODY	15
3.1. Soubor	15
3.2. Metody	15
3.2.1. Bun ěné experimentální a nádorové bun ěné kultury	15
3.2.2. Imunologické reagensie a metody	16
3.2.3. ELISA	17
3.2.4. Western blot.....	17
3.2.5. Histologické vy-et ění.....	19
3.2.6. Immunohistochemie (IHC).....	20
3.2.7. Statistické hodnocení	20
4. VÝSLEDKY	21
4.1. RCC soubor	21
4.2. Soubor uroteliálního karcinomu mo ůvých cest	22
5. DISKUZE	24
ZÁV ĚR	27
SOUHRN	28
POD ĚKOVÁNÍ	30
POUŽITÁ LITERATURA	31
SEZNAM P ĚÍLOH	39
P ĚÍLOHY	40
VLASTNÍ PUBLIKACE K TÉMATU	54

Úvod

Maligní nádorová onemocnění jsou v dnešní době nejen závažným zdravotnickým, ale i celospolečenským problémem. Jejich výskyt v posledních letech neustále vzrůstá. Po kardiovaskulárních chorobách jsou druhou nejvyšší příčinou úmrtí. Z těchto důvodů se stále více pozornosti věnuje jejich přesné diagnostice. Hledají se látky v organismu, které by umožnily rozpoznat nádorové onemocnění před jeho klinickou manifestací, stanovit jeho rozsah, prognózu a také možnost další recidivy. Urologické nádory, kromě karcinomu prostaty a nádoru varlat, nemají vhodné markery, které by umožnily buď jejich primární diagnostiku nebo by byly vhodné pro sledování nemocných po radikální léčbě a zjištění další a tudíž chirurgicky resectabilní recidivy onemocnění. Proto jsem se rozhodl na základě 1) dostupných literárních údajů o přítomnosti karboxykarbonické anhydrázy IX (CA IX) na membránách buněk u urologických nádorů, 2) mého zájmu o onkologickou problematiku a 3) nabídnuté spolupráce kolegů z Institutu organické chemie a biochemie AV ČR v rámci této problematiky a stanovit, zda se CA IX uvolňuje do tělních tekutin a je v nich stanovitelná. Při kladném výsledku posoudit možnost využití jejího stanovení jako markeru primárního nádoru.

1. Literární úvod a přehled dané problematiky.

Jednou z typických vlastností maligních nádorových buněk je produkce různých biochemických látek. Nejvýstílnější a nejčastěji používaný název pro tyto látky je nádorový marker. Méně často jsou v literatuře označovány jako "s tumorem asociovaná substance", "nádorový antigen" a jiné. Do této skupiny řadíme látky produkované maligními buňkami, které 1) se uvolňují do tělních tekutin, kde je možno kvantitativně měřit jejich koncentrace, 2) jsou produkované maligními buňkami, které však do tělních tekutin nepřecházejí a jejich přítomnost lze stanovit imunohistochemickými metodami pouze v nádorové tkáni a 3) vznikají ve zdravých tkáních jako jejich odpověď na přítomnost nádoru v organismu (1).

Jednotlivé nádorové markery se od sebe liší jak svojí chemickou strukturou tak i biologickou funkcí. Podle chemického složení jejich převážná část patří mezi glykoproteiny, glykolipidy a polypeptidy.

Podle biologické funkce většina z nich patří mezi onkofetální látky, které se uplatňují při vývoji plodu. Nejčastěji zde působí jako diferenciační antigeny, přítomné

ve formě glykoproteinových a glykolipidových molekul na povrchu membrán diferencujících se embryonálních a fetálních buněk. Některé markery fungují jako hormony, jiné jsou enzymy, katalyzující různé biochemické reakce v organismu. Další se účastní na transportu biologicky důležitých látek, nebo jsou spojené se zvýšenou proliferací buněk. Poslední skupinou nádorových markerů jsou produkty různých tkání se specifickými funkcemi během vývoje plodu a v období dospělosti, které nemůžeme zařadit do předchozích skupin. Některé z těchto látek fungují například jako zásobní bílkoviny, jiné patří mezi proteiny akutní fáze a mají ochranné funkce při poškození tkání organismu, další jsou zapojeny do imunitních reakcí (1,2).

Aby se nádorové markery mohly úspěšně využívat v onkologické praxi, měly by splňovat následující požadavky:

- 1) být produkovány samotnými nádorovými tkáněmi,
- 2) z maligní tkáně se pohotově a v dostatečné míře uvolňovat do tělesných tekutin,
- 3) změny jejich koncentrací v tělesných tekutinách by měly co nejlépe odrážet změny nádorového růstu a velikost nádorové masy,
- 4) jejich tvorba zdravými tkáněmi by měla být co nejmenší nebo žádná a jejich koncentrace v tělesných tekutinách u zdravého jedince co nejnižší nebo nulové,
- 5) vykazovat maximální specificitu, t.j. správnou negativitu. Specificita udává pravděpodobnost, s jakou má pacient bez diagnostikované choroby negativní výsledek testu. Neměla by být nižší než 90 %. K racionálnímu posouzení správné negativity a falešné positivity v souboru nemocných u jednotlivého pacienta by její hodnota měla být nejlépe 95 %.
- 6) vykazovat dostatečnou senzitivitu, tj. správnou pozitivitu. Udává pravděpodobnost, že pacient s pozitivním výsledkem testu má hledanou chorobu. Neměla by být pod 80 % pro vysoký záchyt správné positivity s nízkou falešnou negativitou.
- 7) mít dostatečný predikční čas (šlead time), což je čas, který uplyne od prvního zvýšení nádorového markeru do klinické diagnózy.

Nádorové markery by m ěly umoci ovat:

- 1) screening maligních nádor ,
- 2) diferenciální diagnostiku mezi maligními a nemaligními onemocn ěními,
- 3) stanovení prognózy,
- 4) stanovení klinického stádia,
- 5) sledování ú ěinnosti protinádorové lé by,
- 6) asné zji-t ění recidivy nádoru (1,2).

Karbonické anhydrázy (CA) jsou skupinou metaloenzym ů obsahujících zinek, které najdeme tém ě u v-ech flivých organism ů (3). Rozd ělujeme je do t ěch rozdílných CA skupin , , , které nevykazují významnou podobnost sekvencí a z ejm jsou kompletn ě odli-ného fylogenetického p ůvodu. V bu kách savc ů se vyskytují výhradn ě karbonické anhydrázy skupiny . Tato skupina zahrnuje 14 len , z nichfl 11 vykazuje aktivitu karbonické anhydrázy. Podle lokalizace v bu ce je m ěme rozd ělit do 4 skupin:

- a) cytozolová (CA I, II, III, VII, VIII)
- b) membránová (CA IV, IX, XII, XIV)
- c) mitochondriální (CA V)
- d) sekre ní (CA VI)

Cytozolové a mitochondriální CA mají pouze doměnu karbonické anhydrázy. Sekre ní CA má je-t ě krátký C-terminální et zec a transmembránové navíc transmembránovou kotvu a krom ě CA IV i cytoplasmatický úsek. CA IX jako jediná karbonická anhydráza má N-terminální proteoglykanovou sekvenci, zprost edkovávající mezibun ůnou adhezi. Aktivitu karbonické anhydrázy r zně intenzity vykazují v-echny CA krom ě CA VIII, X a XI (P ěloha 1).

Vysoce heterogenní distribuce karbonických anhydráz v r zných diferencovaných bu kách a orgánech ukazuje na jejich funk n odli-né úlohy v procesech jako je udrflování acidobazické rovnováhy, vým ěna plyn ů, transport iont ů, fixace uhlíku, ochrana sliznic, resorpce kostí, regulace pH flalude ní kyseliny v blízkosti flalude ní st ny a jiných t ělních tekutin. Ztráta nebo deregulace aktivity n kterých isoenzym ů se ú astní na vzniku onemocn ění jako glaukom, osteopetróza, otoky p ě i srdě ním a ledvinněm selhání, neurologická a neuromuskulární onemocn ění (4).

Karbonická anhydráza IX (CA IX), dříve nazývaná MN nebo MN/CA9 protein, je povrchový buněčný protein, který byl objeven neokévaně při studiu proteinové obálky hypotetického lidského defektního retroviru tvorbou fenotypicky smíšených virionů viru vezikulární stomatitidy. Ty byly vytvořeny v buněčné linii MaTu, odvozené z tumoru prsu (5). Extrakty z těchto buněk obsahovaly protein o molekulové hmotnosti 58 kDa, který imunoprecipitoval s různými lidskými i zvířecími séry. Ke zjištění jeho identity byly vytvořeny monoklonální protilátky, které umožnily rozlišit dvě komponenty, MN a MX (6). Membránově vázaný MN protein byl detekován monoklonální protilátkou M75 a na Western blotu se zobrazil jako dva proufky o molekulové hmotnosti 54 a 58 kDa. Druhá komponenta komplexu MaTu je přenosné agens, provizorně označené jako MX. To bylo identifikováno jako bílkovina o hmotnosti 58 kDa, která se překrývá se zónou 58 kDa z dvojité zóny MN. Rozdíl však tkví v tom, že MX reaguje s protilátkou M67, kdežto MN s protilátkou M75. Mezi nimi není žádná vzájemná reakce. MX navíc reaguje s adou normálních živočišných sér včetně asi 40 % sér lidských. MX byla později identifikována jako defektní varianta LCMV (virus lymfocytární choriomeningitidy), která se in vitro dělí jen při vzájemném kontaktu mezi buňkami. V infikovaných buňkách však elektronový mikroskop neodhalil žádné viriony. (7, 8)

Sekvenci CA9 genu publikoval Opavský a spol. v roce 1996 (9). cDNA kóduje protein skládající se z 459 aminokyselin. Z toho 414 aminokyselin N-terminální extracelulární části je 20 aminokyselinovou hydrofobní transmembránovou oblastí spojeno s C-terminálním intracelulárním koncem, složeným z 25 aminokyselin. Extracelulární část se skládá ze signálního peptidu (37 aminokyselin), z oblasti podobné keratan sulfát vázající doméně velkého proteoglykanového aggreganu (59 AK) a z domény karbonické anhydrázy (257 AK). Protein MN tvoří homodiméry nebo homotriméry spojené disulfidovými vazbami mezi rezidui cystinu (Příloha 2).

Protože CA doména MN proteinu je významně identická s extracelulárními karbonickými anhydrázami a protože v té době byla devátou isoformou identifikovanou ve skupině -CA, byl MN protein přejmenován na karbonickou anhydrázu IX (10). Přítomnost do -CA rodiny podporuje také struktura oblasti CA9 genu kódující CA doménu, která je obdobná jiným savčím genům karbonické anhydrázy. Exony kódující další domény a oblasti CA IX byly získány zejména přesunem exonů. Zvláště PG oblast je pro CA IX jedinečná a nevyskytuje se u dalších karbonických anhydráz -CA rodiny.

Normálně se CA IX vyskytuje ve vnitřním množství pouze ve sliznici flaludku a flaludku (11). Malé množství CA IX lze prokázat ve sliznici stěva a to v oblasti krypt, kde jsou buňky s vysokou proliferací kapacitou (12). Směrem distálním od flaludku její množství ubývá. Minimální hladiny lze dále zjistit v epiteliích pankreatického ductu, muflských gonád a epiteliálních buňkách vystýlajících tlní dutiny (13, 14, 15).

Přítomnost CA IX byla zjištěna ve vysokém procentu (téměř 100 %) u některých typů lidských karcinomů jako je karcinom hrdla dlofního, karcinom jícnu a karcinom ledviny (12, 13, 14, 15, 16, 17). V nižším procentu případů (40 až 60 %) byla stanovena i u karcinomů hlavy, krku, plic, prsu a kolorektálního karcinomu. Vždy se jedná o ektopickou expresi, kdy antigen je přítomen v nádorech vycházejících z CA IX negativních tkání. Nevyskytuje se ve tkáni zdravé ledviny, u nenádorových onemocnění ledviny ani u benigních nádorů, chromofóbní varianty karcinomu ledviny a karcinomu z jasných buněk extrarenálního původu (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25). Naopak u nádorů vycházejících z CA IX pozitivních tkání (flaludek, flaludka) se expresí CA IX proteinu ztrácí nebo je snížena (26, 27). Další studie ukázaly, že sekvence genu v nádorových buňkách je identická se sekvencí genu v normální tkáni (11). To dává předpoklad, že by karboická anhydráza IX mohla být slibným nádorovým biomarkerem.

Mechanismy, které vedou k ektopické expresi CA IX, nejsou zcela známy. Experimentálně lze expresi CA IX vyvolat vysokou denzitou buněk, která aktivuje promotor CA9 (28). Ten řídí přítomnost regulačních oblastí, obsahujících několik cis-úinkujících faktorů (29). Dvě oblasti sousedící s transkripčním iniciačním místem vláí aktivují protein 1 (AP-1) a špecifický proteinů (SP). Jsou to transkripční faktory, jejichfl synergie je nutná k základní transkripční aktivaci CA9 genu (30). Nejdleflit jší regulační část CA9 promotoru je uložena na kódujícím (pozitivním) DNA etzci mezi SP-1 vazebným místem a zaátkem transkripce na pozici -10/-3 a sestává ze sekvence nukleotidů 5'-TACGTGCA-3' odpovídající na HRE (šhypoxia response element) (31). HRE je rozpoznán HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) transkripčním faktorem, který vzniká za hypoxie ze základní beta podjednotky a alfa-podjednotky, regulované kyslíkem. Při normální tenzi kyslíku HIF-1 je modifikován prolinovou hydroxylázou na dvě prolinová rezidua v centrální na kyslíku závislé degrační doméně a následně degračován pVHL tumor supresorovým proteinem (32). Navíc je jeho transkripční aktivita blokována faktorem inhibujícím HIF, která je způsobena hydroxylací reziduí argininu v C-terminální transaktivací doméně (33). Pokud je buňka vystavena hypoxii

nebo dokonce anoxii, HIF-1 uniká hydroxylaci, akumuluje se a po dimerizaci s HIF-1 se stává transkripčním aktivním. Přítomností funkčního HRE se CA9 stává transkripčním cílem HIF-1 a tak se řadí mezi skupinu genů řízených hypoxií (34). HRE se uplatňuje také v transkripci genu CA9, která je spuštěna vysokou densitou buněk. Zde působí ale kooperaci s vedle ležícím SP-1 vazebným místem.

Protože hladina HIF-1 alfa je kontrolována proteinem pVHL, dochází při expresi standardního typu VHL trans genu k supresi transkripce CA9 mRNA v normooxických buňkách. Naopak delece nebo inaktivující mutace vede k uvolnění transkripce CA9 (35). Ztráta funkčního proteinu pVHL je spojena s většíinou karcinom ledviny z jasných buněk a vysvětluje částou přítomnost CA IX proteinu na jejich membránách. Samotná ztráta funkčního proteinu pVHL ale k transkripci CA9 genu nestačí. Navíc je nutná hypometylace v promotorové oblasti genu CA9, zvláště CpG dinukleotid v pozici -74 a -6 vzhledem k začátku transkripce (36). Stav metylace CpG v oblasti -74 ovlivňuje zejména expresi CA IX u jiných karcinomů nefl RCC (37). Lze předpokládat, že expresce CA IX je regulována také na vyšších stupních biosyntetické dráhy podobně jako u jiných genů indukovaných hypoxií.

In vivo expresce CA IX jasně odráží lokalizaci hypoxických oblastí. Protein je detekován v perinekrotických oblastech různých solidních nádorů, včetně karcinomu prsu, kůže, ovaria, hrdla dloňního, hlavy a krku, plic a močového měchýře (38, 39, 41, 42, 43). Měním u karcinomu hlavy a krku se zjistilo, že expresce CA IX začíná ve vzdálenosti 40-140 μm (medián 80 μm) od kapiláry a pokračuje směrem k nekróze (44). Podobné prostorové rozložení CA IX k mikrocirkulaci lze nalézt i u karcinomu močového měchýře a plic (45, 46). Srovnáme-li CA IX expresi s distribucí HIF-1 a chemického markeru hypoxie EF5, expresce CA IX začíná dále než HIF-1 a dříve než EF5. To znamená, že indukce CA IX vyžaduje nižší hladinu kyslíku než HIF-1 alfa a že se vyskytuje v perinekrotické oblasti, která je větší než zóna označená EF5 (47). Dále prokázali, že CA IX exprimující buňky, izolované z nádorových xenograftů jsou životaschopné, klonovatelné a rezistentní k letálnímu efektu ionizujícího záření. To ukazuje, že část nádorových buněk exprimujících CA IX je stejně závislá na oxygenaci a představuje potenciální zdroj metastáz. Předchozí nálezy intranádorové distribuce CA IX ukazují, že hypoxie není jediným spouštějícím faktorem její expresce. Imunohistochemické studie ukazují, že expresce CA IX je i u nádorů, které nevykazují známky hypoxie (přítomnost nekróz, expresce HIF-1, VEGF atd.) a naopak. Koexpresce

CA IX s c-ErbB2, EGFR a MUC-1 ukazuje na možnou úlohu v regulaci onkogenních mechanismů. To vyžaduje ještě další zkoumání (40, 25).

V normální sliznici CA IX slouží jako diferenciální antigen (48). Předpokládá se, že anhydrázová část funguje jako regulátor pH a účastní se na transmembránovém transportu iontů. Nižší extracelulární pH podporuje invazivní růst nádorových buněk, zvýšená koncentrace Ca^{2+} kationtů v cytoplazmě aktivuje buněčné tyrosin-specifické proteinkinázy. Proteoglykanová doména CA IX funguje jako adhezivní molekula, která se účastní diferenciace sliznice zafékalního traktu, zprostředkuje spojení buněk mezi sebou a s neadhezivními solidními tkáněmi. Předpokládá se, že i zprostředkuje komunikaci mezi buňkami. Při ektopické expresi může vést k přenosu falešných signálů. To zejména hraje důležitou úlohu i v karcinogenezi. Jeho 100 % ektopická exprese u téměř lidských karcinomů a nižší ale významná i u těch, kterých další podporuje tuto domněnku. Jednou z dalších možných rolí je inhibice apoptózy v nádorové buňce (49). Na základě pozorování se předpokládá, že CA9 je protoonkogenem.

CA IX protein lze prokázat buďto imunohistochemickým barvením v histologickém preparátu na buněčné membráně a na toto téma bylo publikováno doposud asi 1509 prací. Pomocí reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) lze v krevním vzorku zjistit mRNA kódující CA IX protein v uvolněných cirkulujících buňkách. Specificita vyšetření byla 100 %, senzitivita metody je obrovská a stačí k odhalení jediné nádorové buňky v 1 ml krve, avšak záchytnost je nízká, pouze 25 až 49 %. Nevýhodou této metody je, že stanovuje CA9-mRNA v nádorových buňkách při jejich diseminaci (50). Tím lze i vysvětlit nízkou záchytnost této metody.

Vzhledem k publikované vysoké expresi CA IX na membránách buněk karcinomu ledviny a expresi u uroteliálních karcinomů vývodných močových cest jsme se zaměřili v naší práci na tyto dva nádory (45). Oba jsou v naší populaci časté, dokonce v incidenci karcinomu ledviny zaujala Česká republika nelichotivé první místo na světě. Ani u jednoho nádoru doposud neexistuje skutečný diagnostický marker, který by umožnil jeho jednoduché a neinvazivní stanovení v časném stadiu a tak umožnil jejich radikální léčbu nebo se dal použít při sledování nemocných po radikální léčbě k odhalení časně recidivy onemocnění.

1.1. Karcinom ledviny

Karcinom ledviny (RCC) tvo í p ibliífn 2-3 % v-ech solidních nádor dosp ělé populace. Jedná se o heterogenní skupinu karcinom s jedine ným morfologickým obrazem vycházejících z epitelu renálních tubul . Každý rok se diagnostikuje kolem 30000 nádor v USA a 20000 v Evropské unii. Nádor se vyskytuje nej ast ji mezi pátou a sedmou dekáadou íivota. Muíi jsou postífeni p ibliífn dvakrát ast ji neíí ženy. V t-ina karcinom je sporadických, pouze asi 4 % jich je familiárních. U jedné t etiny nemocných je v dob diagnózy zji-t na generalizace onemocn ní a u více neíí poloviny nemocných s lokalizovaným nádorem onemocn ní progreduje v dal-ím pr b hu. Karcinom ledviny je nejletáln j-ím urologickým zhoubným nádorem. Zem e na n j více neíí 40 % nemocných. V roce 2000 bylo v eské republice hlá-eno celkem 2289 nových karcinom ledviny (1346 u muíí a 943 u žen). To znamenalo hrubou incidenci 22,3/100 000 obyvatel (26,9 pro muíí a 17,9 pro ženy). V tom samém roce 2000 zem elo na tento nádor 1185 nemocných (728 muíí a 457 žen). Mortalita byla 11,5/100000 obyvatel (14,6/100 000 muíí a 8,7/100 000 žen) (51). V roce 2008 byla incidence jíí 27,14/100 000 a mortalita jen 11,13/100 000 obyvatel, to znamená níí-í neíí v roce 2000 (P íloha 3). Od roku 1980 do roku 2008 se incidence zvý-ila více neíí 3,5 krát, mortalita stoupala mírn ji.

Tyto rozevírající se n ílky jsou í sledkem jednak pokroku v úsp -nosti komplexních lé ebných postup , jednak ve zvý-ení záchytnosti radikáln e-itelných stádií onemocn ní. To bylo umofn no rozvojem zobrazovacích metod, zejména ultrasonografie, výpo etní tomografie a magnetické rezonance v pr b hu osmdesátých let. Jejich postupné zavedení do b ífné klinické praxe zvý-ilo záchytnost incidentálních tumor u asymptomatických nemocných (52, 53, 54, 55, 56, 57). íada odborných prací potvrzuje nov í fakt, íe incidentální nádory jsou významn níí-ího stadia, gradeu a je níí-í procento lokálních recidív í vzniku vzdálených metastáz oproti nádor m symptomatickým. Také p íleté nádorov specifické p eíívání nemocných s incidentálním RCC oproti symptomatickému (85,3 % versus 62,5 %) je statisticky významn lep-í (58, 59, 60, 61, 62). Proto se pro dal-í zlep-ení výsledk lé by diskutuje provád ní systematického screeningu pomocí ultrasonografického vy-et ení ledvin v populaci. Názory na jeho provád ní jsou rozporuplné a jeho oponenti argumentují jeho vysokou cenou k záchytnosti nových nádor u onemocn ní s tak nízkou prevalencí v populaci. Nejv t-í studie byly provedeny v Japonsku, kde bylo p í preventivních

prohlídkách vyšetřeno sonograficky 200000 a 60604 respondentů s nálezem 192 (0,096%) respektive 14 (0,023%) karcinom ledviny (63, 64). Proto je screening doporučen pouze u populace s vysokým rizikem. Jde o nemocné v konečném stadiu renálního selhání, nemocné s von Hippel-Lindauovým onemocněním a jejich příbuzné, příbuzné nemocných s dalšími familiárními karcinomy ledviny a tuberózní sklerózou.

Jedním z možných cílů aktivního screeningu RCC by bylo nalezení vhodného biomarkeru, který by bylo možné stanovovat v krvi nebo moči nemocných a který by vykazoval dostatečnou senzitivitu i specificitu.

Jako biomarker může představovat chemickou substanci, která je produkováná buď samotným nádorem nebo jinými tkáněmi jako reakce na přítomnost maligního bujení v organismu. U zdravého jedince se nevyskytují nebo se vyskytují v podstatně nížší koncentraci než v případě přítomnosti nádoru. Ideální nádorový marker by měl být maximálně senzitivní (počet pozitivních nálezů/celkový počet vyšetřovaných - nízká falešná negativita), maximálně specifický (správně negativní vyšetření/počet zdravých vyšetřovaných - nízká falešná pozitivita), jeho koncentrace by měla korelovat s hmotností nádoru a mít dostatečnou predikční sílu (předstih markeru před klinickým prokazem).

V současné době zkoumané markery zahrnují DNA parametry, markery buněčné proliferace, angiogeneze, apoptózy, růstové faktory, tumor-supresorové geny, adhezí molekuly, cytogenetické abnormality a řadu dalších. Téměř všechny hodnotí do určité míry biologické chování nádoru a předpokládá se jejich uplatnění jako prognostických indikátorů. Skutečný diagnostický marker pro screening karcinomu ledviny nebo sledování nemocných po radikální léčbě zatím neexistuje. V literatuře lze nalézt zprávy o těchto možných markerech, stanovitelných v periferní krvi: vaskulární endoteliální faktor, sérový amyloid A, insulinu podobný růstový faktor-1 a karbonická anhydráza IX. Pro diagnostiku uplatnitelný se zdá pouze CA IX protein, ostatní spíše hodnotí biologické chování tumoru.

McKiernan stanovoval CA IX mRNA pomocí reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) v předoperačním krevním vzorku nemocných s lokalizovaným RCC a u zdravých kontrol. Nalezl CA IX mRNA u 86 % nemocných s RCC. U nemocných s benigními lézemi byly hladiny CA IX mRNA nulové a ve zdravé kontrolní skupině je nalezen v 1,8 % probandů (65). Další sledováním stejné skupiny 41 nemocných s RCC se ukázalo, že ve skupině nemocných s negativním CA

IX před operací bylo přítomné před léčbou bez progresu 88 % proti 40 % ve skupině CA IX pozitivní (66).

1.2. Uroteliální nádory močových cest

Uroteliální karcinomy (UC) vývodných močových cest vycházejí z přechodního epitelu, který vystylá močové cesty od ledvinné papily až po část močové trubice. Tyto nádory se nejčastěji vyskytují v močovém měchýři, kde představují až 98 % všech zhoubných nádorů. V oblasti ledvinné pánvičky a močodu jsou mnohem vzácnější. Ze všech maligních nádorů ledvin je pouze 6-7 % nádorů z urotelu. Tvorbí pouze 4 % všech uroteliálních tumorů. Poměr nádorů močových k nádorům ledvinné pánvičky a močodu je 51:3:1 (67).

Uroteliální karcinomy močového měchýře jsou druhým nejčastějším nádorem urogenitálního traktu. Častěji jsou postiženi muži než ženy 2,7:1 a jejich záhyt je nejvyšší v 6. dekádě života. Incidence tohoto nádoru se stejná jako u RCC v České republice zvyšuje. V roce 1980 byla incidence 9,01/100 000 obyvatel a mortalita 5,26/100 000, v roce 2008 byla incidence již 24,52/100 000 obyvatel a mortalita jen 8,31/100 000 obyvatel (Příloha 4).

V době diagnózy je jejich zhruba 85 % lokalizovaných na močovém měchýři a 15 % již s generalizací do lymfatických uzlin nebo do jiných vzdálených orgánů. V 90 % se jedná o karcinomy z přechodního epitelu, v 6-7 % o epidermoidní karcinom a pouze v 1-2 % o adenokarcinom. Onemocnění je diagnostikováno a dále monitorováno uretrocystoskopií, cytologií a zobrazovacími metodami horních močových cest (IVU, CT). Cystoskopie, která je považována za zlatý standard, může ale přehlédnout oblastí karcinomu in situ. Navíc se jedná o vyšetření invazivní pro nemocného a i finančně nákladné. Cytologické vyšetření vzorku moče má střední senzitivitu pouze 35 % a střední specificitu 94 % (68). Uplatňuje se zejména v diagnostice šhigh-grade nádorů a karcinomu in situ. Nízká senzitivita u low-grade tumorů snižuje její klinický význam. Limity cytologie a invazivita uretrocystoskopie vedou ke hledání méně invazivních diagnostických metod. V posledních letech se nejvíce studují a jsou publikovány práce o fluorescenční in situ hybridizaci (FISH), mikrosatelitové analýze (MSA), imunocytologické diagnostice nádoru předřazených antigenů (ImmunoCyt), stanovení telomerázové aktivity, stanovení komplementového faktoru H- předřazeného proteinu (BTA-TRAK, BTA-stat), stanovení kyseliny hyaluronové a hyaluronidázy

v moči (HA-HA-ázá), stanovení proteinu nukleární matrix 22 (NMP22), stanovení proteinu nukleární matrix BLCA-4, cytokeratin (CYFRA 21-1) a survivinu. Ideální marker by měl mít vysokou senzitivitu a specificitu, snadnou reprodukovatelnost a nízkou cenu. Všechny výše uvedené markery jsou lepší než cytologie v senzitivitě, ale méně vhodné ve specificitě (Příloha 5).

Pro klinickou praxi je dostupný NMP22Bladder Check assay, který je snadno proveditelný, senzitivitu má méně než cytologie, specificita se pohybuje mezi 40-87 %, je citlivý i u low-grade tumorů a není ovlivněn BCG terapií. Nevýhodou je, že není jasně definována hodnota výsledku, kdy doporučit provedení cystoskopie.

Další dostupný test je BTA-TRAK a BTA-stat. Oba testy vykazují nízkou senzitivitu i specificitu než cytologie a jejich výsledky jsou ovlivněny benigními urologickými onemocněními (uroinfekce, hematurie). Posledním v praxi dostupným je UBC Rapid test (UBC - Urinary Bladder Cancer Antigen). Tímto testem se detekují v moči cytokeratiny 8 a 18, které jsou markerem karcinomu epitelálních buněk. Specificita testu je 90 % a senzitivita 70-80 %, pozitivní prediktivní hodnota 86 % a negativní prediktivní hodnota 81 % (69).

Ostatní testy jsou náročné na provedení a dražší. Z nich nejslibnější se zdá mikrosatelitová analýza, která vykazuje dobrou senzitivitu (72-97 %) i specificitu (80-100 %) a je schopná detekovat tumory nízkého gradeu a T kategorie. Provedení testu je ale náročné. Další perspektivní jsou stanovení kyseliny hyaluronové a hyaluronidázy a survivinu. Vykazují dobrou specificitu i senzitivitu, jsou schopny detekovat tumory nízkého gradeu. Jsou ale nutné další studie (Příloha 5). Zatím neexistuje jediný marker, vhodný pro sledování nemocných s uroteliálními tumory, který by snížil četnost nutných uretrocystoskopií v rámci dispenzarizace (70).

2. Cíle práce

V naší práci jsme si stanovili tyto cíle:

- 1) Zjistit, zda dochází k uvolnění CA IX do média během kultivace nádorových buněčných experimentálních kultur, které mají na své buněčné membráně CA IX protein.
 - 2) Liší se solubilní forma CA IX od formy membránové?
 - 3) Jaká je koncentrace CA IX v kultivačním médiu experimentálních kultur?
 - 4) Uvolní také krátkodobě přechodící kultury lidských nádorů CA IX do kultivačního média a pokud ano, jaké jsou koncentrace?
 - 5) Je solubilní CA IX (s-CA IX) stanovitelná v séru nebo moči nemocných s urologickými tumory exprimujícími CA IX?
 - 6) Pokusit se stanovit clearance s-CA IX po chirurgickém odstranění nádoru.
 - 7) Má vliv na koncentraci s-CA IX velikost nádoru nebo jeho grade?
 - 8) Je detekovatelná s-CA IX v krvi nebo séru zdravých dobrovolníků?
 - 9) Je s-CA IX vhodným markerem pro možné stanovení zkoumaných nádorů?
- Pro naše experimenty jsme si vybrali nemocné s adenokarcinomem ledviny a poté s uroteliálními tumory, kde z literárních údajů je exprese CA IX proteinu ve velkém množství a u vysokého počtu nádorů.

3. Soubor a metody

3.1. Soubor

V naší prospektivní studii probíhající v letech 2004 až 2008 jsme vytvořili dvě skupiny pacientů: 1) nemocní s karcinomem ledviny, 2) nemocní s uroteliálními tumory močového měchýře nebo kalichopánvičkového systému.

V první skupině bylo testováno 44 pacientů s adenokarcinomem ledviny (RCC), 15 pacientů s nonRCC tumory, ty i pacienti s nenádorovým urologickým onemocněním a 42 zdravých sloužilo jako kontrolní skupina (Příloha 6).

U nemocných s RCC jsme odebírali krev a eventuálně moč před výkonem a znovu krev pátý den po operaci. Vzorky byly co nejrychleji transportovány do laboratoře a zmrazeny při teplotě -80° Celsia. U některých nemocných jsme odebrali po nefrektomii část vitální nádorové tkáně pro krátkodobé pěstující buněčné kultury.

Do druhé skupiny bylo zahrnuto 31 pacientů s endoskopickým podezřením na uroteliální karcinom močového měchýře (UC), v jednom případě ledvinné pánvičky a 16 kontrol (Příloha 7).

V této skupině jsme odebírali krev a moč pouze před operačním výkonem. Nádorová tkáň se mikroskopicky vyšetřovala jednak po barvení hematoxylinem a eosinem a jednak v indikovaných případech imunohistochemicky na membránovou formu CA IX proteinu. Velikost nádoru se stanovila zobrazovacími metodami (ultrazvuk, CT, NMR), z operačního preparátu nebo endoskopicky porovnáním s velikostí resekční kličky endoresektoru. Tato studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole.

3.2. Metody

3.2.1. Buněčné experimentální a nádorové buněčné kultury

Jako standardní nádorovou linii, která se snadno kultivuje a množí in vitro a obsahuje CA IX protein o molekulové hmotnosti 54 a 58 kDa ve velkém množství, jsme použili buněčnou linii HT29 (DSMZ ACC299), odvozenou z buněk kolorektálního karcinomu. Buňky byly kultivovány v Dulbeccem modifikovaném Eaglově roztoku (DMEM) obohaceném 10 % fetálním telecím sérem (FCS, Gibco).

Primární kultury z buněk lidských karcinomů se pěstují in vitro obtížně. Proto jsme použili krátkodobé kultury, které jen přetrvávají, ale buňky se trvaleji nemnoží.

Nádorové bu ky získané z excizí nádorové tkán ě byly propláchnuty fyziologickým roztokem s fosfátovým pufr em (PBS, pH 7,2), suspendovány v DMEM s 10 % FCS (cca 50-100 mg čerstvé váhy nádorové tkán ě do 5 ml média) a inkubovány v 5 cm Petriho miskách p ě i teplot ě 37,1° Celsia v inkubátoru v atmosfé e s 5 % CO₂. Pufr k lýze bun ěk obsahoval PBS s 1 % Igepal CA-630 (Sigma), 0,25 % deoxycholát a inhibitory proteáz (1mM fenylmetylsulfonylfluorid a 200 trypsin inhibi ních jednotek Trasylolu/ml).

3.2.2. Imunologické reagensie a metody

Ke stanovení koncentrace CA IX proteinu v extraktech a kultiva ních médiích z experimentálních bun ěných linií a krátkodob ě p ěfflvajících RCC bun ěných kultur jsme pouřili monoklonální protilátka M75 (mAb M75), vyvinutou Pastorekovou a kol. (6). Její isotyp je IgG 2b. Epitop MAb M75 je lokalizován v PG doměn ě a jeho sekvence aminokyselin je PGEEDLP (49).

V t ělních tekutinách jsou koncentrace CA IX velmi nízké, proto bylo nutné pouřít dv ě protilátky, jednu ke koncentraci antigenu a druhou k vizualizaci potencovanou chemiluminiscencí. Ke koncentraci jsme pouřili mAb V-10, jejíř isotyp je IgG 2a a její epitop je lokalizovaný v CA doměn ě CA IX proteinu. K vizualizaci slouřila vý-e zmín ěná mAb M75. Imunoglobuliny IgG byly purifikovány z kultiva ního media hybridomových bun ěk afinitivní chromatografií (49).

Ke koncentraci imunokomplex ětv ených mAb s CA IX antigenem z média nádorových bun ěk nebo bun ěného extraktu jsme pouřili Protein A-Sepharosu (Sigma). Komplexy mAb-CA IX z lidského séra nebo mo ěe byly adsorbovány na agarosu s navázanou protilátkou k my-řimu IgG. Imunoperoxidázový konjugát mAb M75-Px byl p ěpraven za pouřítí kitu pro zna ění peroxidázou (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, N mecko). Imunoprecipitace s-CA IX z lidského séra nebo mo ěe se provád ěla následovn ě : k 0,75 ml séra nebo 10 ml mo ěe vy e ených centrifugací byly p ěidány 2 μg mAb IgG V-10 a ponechány reagovat 60 minut p ě i pokojové teplot ě. Potě bylo do kařdého vzorku p ěidáno 50 ě 150 % p ěedepraných anti-my-řích IgG agarózových perli ěk a suspenze byla dána do rotátoru na 4 hodiny nebo p ěes noc p ě i teplot ě 4° C. Následn ě jsme agarózová zrna s navázaným my-řím IgG a imunitními komplexy centrifugovali p ě i 1200 otá kách/minutu dv ě minuty. Pelety jsme resuspendovali v 1 ml PBS s 0,05 % Tweenem 20 (PBS-T, Sigma), znovu centrifugovali a zah ěli na 100° C

na 5 minut v 60 µl Laemmliho pufru s přidávkem 2,5 % merkaptoethanolu a 1,5-2 % FCS.

3.2.3. ELISA

ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), někdy také označovaná jako EIA (Enzyme Immunoassay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek nebo antigenu. Metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů. Za prvé je to jejich schopnost vázat se na povrch umělých hmot (např. polystyrenu) a za druhé pak schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul. Pro praktický antigen existují různé modifikace ELISA testu: Přímá ELISA a nepřímá sendvičová ELISA (71).

Sendvičový byl složený z těchto vrstev: 1) dno mikrotitrační destičky nebo proufky bylo pokryto monoklonální protilátkou IgG V-10 (capture antibody), 5µg/ml v 50 mM karbonátovém pufru o pH 9,6, který byl adsorbován 3 hodiny při pokojové teplotě, 2) roztok testovaného antigenu v PBS s 0,05 % Tween 20 byl adsorbován přes noc při teplotě 4°C, 3) M75-Px konjugát (detector antibody) 1:5000 v PBS s 0,05 % Tween 20 se nechal 2 hodiny vázat při pokojové teplotě. Po krocích 1-3 byly destičky vymyty PBS s Tween. 4) Nakonec byla přidána směs ortofenylen diaminu (OPD, Sigma) 1mg/ml ve 100mM fosfát/citrátovém pufru o pH 5,0, 1 µl 30 % H₂O₂ (Sigma). Reakce probíhala 30 minut v temnu při pokojové teplotě. Reakce byla ukončena přidáním dvou kapek 2N H₂SO₄ na jamku. Použili jsme proufky MaxiSorp nebo destičky (NUNC, Denmark). Po ukončení reakce jsme měřili absorbanci pomocí fotometru při vlnové délce 485 nm.

3.2.4. Western blot

Western blot (též označovaný jako imunoblot) je analytická technika vhodná k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny, například ve vzorku homogenátu tkáně i jiného biologického vzorku. Separace proteinů podle jejich velikosti (denaturující SDS-PAGE) nebo jejich celkové trojrozměrné struktury (nativní elektroforéza) se dosahuje gelovou elektroforézou. Následně jsou proteiny přeneseny ("přebírány") z gelu na povrch membrány (nejčastěji nitrocelulosevé i PVDF), na jejímž povrchu jsou detekovány specifickými protilátkami. Proti bílkovinám

sérologickým metodám jako je ELISA, je western blot sice ásov náro n j-í a drař-í, ale vykazuje v t-í specifi nost. Metoda dostala své jméno western blot jako slovní h í ka na podobnou metodu Southern blot, pouřřivanou k detekci DNA vyvinutou d íve Edwinem Southernem.

První ást se skládá z klasické SDS-PAGE elektroforézy, kdy je antigen nanesen do polyakrylamidového gelu a separován v elektrickém poli podle své molekulové hmotnosti. Jednotlivé proteiny vytvá ejí v gelu prouřřky. Gel z elektroforézy se následn p ilořří na PVDF i nitrocelulóзовou membránu a pomocí blotovacího za řzení dojde p sobením elektrického proudu k p enosu protein ů z gelu na povrch membrány. Na membrán v znikne jakoby řkopieř protein ů separovaných na gelu. P řstroj je realizován jako soustava anody a katody. Záporn ě nabité proteiny obalené SDS jsou elektrickým proudem p eneseny z gelu sm rem k anod . Aby povrch membrány nevázal i p idané protilátky, je nutné jej zablokovat. Blokování t chto nespecifických míst se nej ast ji provádí umíst ěním membrány do z ed něho roztoku n jakého proteinu - nap . 3 - 5 % BSA i netu ně suché mléko v TBS, s p řídavkem slabého detergentu jako je Tween 20 (0,05 %). Proteiny BSA i mlé něho kaseinu z roztoku se navářří na v-echna místa, kam se dosud nenavázaly proteiny p i p enosu. Po p idání protilátky se uřř molekuly imunoglobulin ů nemohou nespecificky navázat na prázdny povrch membrány, ale vářří se pouze specificky na sv j epitop na p eblotovaných antigenech. Blokování výrazn řniřřuje řum pozadí a odstra ůje fale-né pozitivitu.

Pro zviditeln ění daného proteinu je nutné pouřřit specifickou protilátku proti tomuto proteinu. Existují dva základní principy detekce. Jednokroková detekce vyuřřívá primární protilátku, která je konjugována s reportérovým enzymem. Dvoukroková detekce kombinuje primární protilátku a sekundární protilátku konjugovanou s reportérovým enzymem. U dvoukrokové detekce je po blokování membrána p enesena do z ed něho roztoku primární protilátky (o koncentraci typicky 0,5-5 g/ml) v puřřovaném roztoku (nap . TBS i PBS) BSA i mlé něho kaseinu. Inkubace s primární protilátkou probíhá za mírného míchání, po dobu od 1 hod ařř p es noc za laboratorní teploty i p i 4 °C. Po opláchnutí membrány puřřovaným roztokem detergentu (nap . PBS+ 0,05 % Tween 20) je membrána p enesena do roztoku sekundární protilátky. Komer n dodávané protilátky jsou proti celé řkále primárních protilátek nej ast ji my-řřho i králi řřho p vodu, cořř jsou skoro vřřdy primární protilátky. Tyto sekundární protilátky jsou konjugovány s n jakým reportérovým

enzymem umožn ějícím vizualizaci, například k enovou peroxidázou i alkalickou fosfatázou.

P ěi jedнокrokové detekci je reportérovým enzymem zna ena p ěímo primární protilátka. Vizualizace je dosaženo dv ma zp soby. Kolorimetrie vyvolává reakce reportérového enzymu (nap . peroxidázy) s chromogenním substrátem. Enzym p ěm ěje rozpustný (a bezbarvý) substrát na nerozpustný a barevný (nap . modrý) produkt. Množství proteinu je poté semikvantitativn ě stanoveno densitometrií ("jak moc barevná je daná skvrna"). U chemiluminiscence reportérový enzym (peroxidáza) p ěm ěje chemiluminiscen ní substrát na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzá ěním kvanta sv tla. Intenzita sv tla je poté úm ěrné množství peroxidázy, které je p ěímo úm ěrné množství daného proteinu. Uvol ované sv tlo je pak zachyceno na sv tlocitlivém filmu nebo nov ěji pouřlitím CCD-kamer. Pro kvantifikaci je op t možné pouřlit densitometrii (71).

Natrium dodecyl sulfát-polyakrylamidová gelová elektroforéza a western blotting byly provedeny jak bylo uvedeno d ěíve (49). CA IX antigen byl na blotech zobrazen pomocí M75-Px konjugátu s následnou potencovanou chemiluminiscencí (ECL) a expozicí na Rtg film Medix XG (FOMA, ěeská republika) s maximální citlivostí na fluto-zelené sv tlo.

Každou membránu s navázanými proteiny vyvoláváme například v roztoku monoklonální protilátky M75 konjugované s peroxidázou, která ozna ěí antigen CA IX. Následuje láže obsahující luminol, H₂O₂ a kyselinu kumarovou. Peroxidáza navázaná na protilátku katalyzuje oxidaci luminolu peroxidem vodíku, ěímž vznikají záblesky sv tla. Ty se exponují na citlivý film. Pro každý blot uříváme nejmén ě dv expozice: 5 minut pro materiály od pacient ů s vyří hladinou antigenu a 30 minut pro materiály od zdravých individuí. Ty pokládáme za śnegativní, a obsahují také CA IX, ale jen 0.2 ó 5 pg/ml. Každý blot obsahuje také standardní koncentrace CA IX jako kalibraci. V tomto p ěpad ěto byla CA IX vyrobená metodami genového inřenřství, purifikovaná afinitní chromatografií a koncentrace zásobního preparátu byla stanovena chemicky.

3.2.5. Histologické vy-ět ění

Chirurgicky odstran ěné nádorové tkán ě byly co nejd ěíve po odb ru fixovány v 10 % formalinu, zality do parafinu a barveny standardn ě hematoxylinem-eosinem pro mikroskopické vy-ět ění.

3.2.6. Immunohistochemie (IHC)

Tká ové ezy o tloušťce 4 μm byly deparafinovány xylenem a rehydratovány snižujícími se koncentracemi roztoku alkoholu ve vod ě . Po standardní blokád ě endogenní peroxidázové aktivity po 20 minut p ě pokojové teplot ě , byly tká ové ezy inkubovány p ě noc p ě 4 $^{\circ}\text{C}$ s anti-CA IX protilátkou M75 (tká ová tekutina z hybridomu v ěd ní 1:50) (7). Komplexy antigen-protilátka se zobrazily pomocí univerzálního imunoperoxidázového polymerního detek ního kitu N-Histofine, Simple Stain MAXPO multi (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) s 3,3 diaminobenzidinem (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) jako chromogenem.

Pouze membránové barvení bylo bráno jako pozitivní výsledek. Immunohistochemické barvení CA IX bylo hodnoceno pod malým zv ět ěn ěm semikvantitativn ě do 4 kategorií procentem CA IX pozitivních nádorových bun ěk. Skóre 0 znamená 0 % , skóre 1 < 10 % , skóre 2 10-50 % a skóre 3 > 50 % CA IX protein pozitivních bun ěk. Distribuce a rozsah CA IX positivity byl hodnocen se zam ěn ěm na perinekrotické oblasti nádoru.

3.2.7. Statistické hodnocení

Pro statistický výpo ět byl pouflit program StatView (SAS Institute, Cary, NC, USA). Rozdíly mezi studijními skupinami byly porovnány pomocí neparametrického MannóWhitney testu a chí-kvadrát testu. Hranice signifikance byla $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1. RCC soubor

V souboru karcinomu ledviny byly vyšetřovány vzorky od 63 nemocných. Soubor byl dále rozdělen na podskupinu nemocných s histologicky prokázaným karcinomem ledviny (n=44). Nemocní s histologicky odlišným nádorem nefl karcinom (n=15) byli zařazeni spolu s nemocnými s nenádorovými onemocněními (n=4) do podskupiny kontrolní. Jako další kontroly jsme ještě zařadili séra, získaná od zdravých dárců krve (n=42).

V podskupině nemocných s prokázaným RCC velikost tumoru byla 20 až 170 mm (průměr 65 mm), dále jsme z histologického nálezu stanovili pT kategorii a grade (P íloha 8, P íloha 9). Retroperitoneální lymfatické uzliny byly postiženy u 4 nemocných (1x N1, 3x N2) a vzdálené metastázy u 5 nemocných z nichž pouze u dvou byly postiženy také retroperitoneální lymfatické uzliny.

Z tkáně zdravé ledviny, angiomyolipomu a části preparátů karcinomu ledviny získané po nefrektomii jsme odebrali vzorky k přípravě extraktu, ve kterém jsme stanovili přítomnost a koncentraci CA IX proteinu. Na western blotu se CA IX protein zobrazuje jako dvojitý proušek o molekulové hmotnosti 58 a 54 kDa. Ve všech částech extraktů z RCC nádorové tkáně byl přítomen CA IX protein ve vysoké koncentraci 0,5-2 mg/g celkového proteinu. V extraktu tkáně zdravé ledviny a angiomyolipomu CA IX nebyl přítomen (P íloha 10).

Část vitální tkáně nádoru jsme také kultivovali in vitro a v těchto krátkodobých tkáňových kulturách jsme poté prokázali uvolnění extracelulární části CA IX proteinu do kultivačního média jako solubilní formy CA IX proteinu (s-CA IX). Solubilní CA IX je kratší o transmembránovou a intracytoplazmatickou část a má molekulovou hmotnost 54 a 50 kDa. Koncentrace s-CA IX v rýstovém médiu z nádorových explantátů se pohybuje v rozmezí 20- 50ng/ml.(P íloha 11)

V séru pozitivní s-CA IX protein jsme zjistili pouze v podskupině s histologicky prokázaným karcinomem ledviny (P íloha 12). Z 35 vyšetřovaných vzorků jich bylo 26 (74,3 %) pozitivních. Ve druhé podskupině non-RCC tumorů a jiných nenádorových urologických onemocnění byly všechny vzorky na s-CA IX protein negativní.

V moči je vyšetření usnadněno tím, že od pacientů můžeme získat větší odběry nefl v případě krve a dále tím že moč obsahuje mnohem méně bílkovin nefl sérum.

Vysoký obsah bílkovin v koncentrovaném preparátu znemožnil uje analýzu s-CA IX. V podskupině s přítomným RCC byl s-CA IX protein prokázán v množství u 19 (63,3 %) z 30 vzorků. V kontrolní skupině, zahrnující 30 vzorků (25 zdravých kontrol, 3 non-RCC tumory, 2 jiná urologická onemocnění), byly všechny vzorky s-CA IX negativní.

U postižených s RCC jsme stanovili koncentraci s-CA IX před a pátý den po operačním výkonu (Příloha 13). Ve všech případech je vidět významný pokles hladiny s-CA IX po výkonu, u jednoho nemocného pouze mírný (druhý vzorek odebrán z technických důvodů první den po operaci). U jednoho nemocného (č. 68) je naopak pozorovatelná vyšší hladina s-CA IX. Zde byla provedena pouze operační revize a pro operačně neřešitelný nález nádor nebyl odstraněn. To dokazuje, že zdrojem s-CA IX jsou jasně buňky RCC.

V příloze 14 jsou uvedeny přehledné údaje koncentrace CA IX proteinu v jednotlivých biologických materiálech, jak jsme je stanovili během naší práce. Výsledky v buněčných extraktech a kultivačním mediu byly stanoveny metodou ELISA. V séru a moči, pro nízkou koncentraci s-CA IX, bylo nutno použít densitometrické hodnocení film exponovaných šWestern blotů a porovnání se standardními koncentracemi s-CA IX.

Statistickým hodnocením jsme neprokázali žádný statisticky významný rozdíl ve výskytu parametrů pT, G, N, M a velikosti nádoru mezi CA IX pozitivními a CA IX negativními skupinami a dále mezi CA IX pozitivní skupinou v séru a CA IX pozitivní skupinou v moči.

Senzitivita, specificita, pozitivní prediktivní hodnota a negativní prediktivní hodnota pro CA IX v séru, moči a obě skupiny dohromady je uvedena v příloze 15.

4.2. Soubor uroteliálního karcinomu močových cest

Ve druhé skupině nemocných s uroteliálními tumory dolních a horních močových cest bylo hodnoceno 32 nemocných s podezřením nebo prokázaným uroteliálním karcinomem. U sedmi byla provedena radikální cystektomie, u jednoho nefroureterektomie a u ostatních transuretrální resekce tumoru močového měchýře.

Karcinom vycházející z urotelu byl histologicky prokázán u 23 (71,9 %) nemocných, u jednoho z nich se jednalo o karcinom spinocelulární. Zastoupení pT kategorií a gradeu je uvedeno v následujících grafech (příloha 16, příloha 17).

V této skupině byla s-CA IX v moči pozitivní u 16 (69,6 %) nemocných a jeho koncentrace se ve většině případů pohybovaly mezi 5-40 pg/ml (Příloha 18). Sérové koncentrace s-CAIX byly u všech superficiálních tumorů negativní.

Negativní nález s-CA IX byl u 7 (30,4 %) pacientů s mikroskopicky prokázaným uroteliálním karcinomem. V tabulce 4 je soubor UC pozitivních nemocných rozdělen do skupin podle výsledků mikroskopického, imunohistochemického vyšetření a Western blotu (Příloha 19).

U 10 nemocných, i přes endoskopicky pozitivní nález, UC ve vzorku získaném transuretrální resekci nebyl mikroskopicky prokázán. U 7 z nich byl s-CA IX pozitivní. U dvou z nich se při dalším sledování prokázala recidiva UC, u dvou byl preparát drobný a termicky znehodnocený a u jednoho byla zjištěna metaplasie urotelu.

Imunohistochemické barvení prokázalo CA IX protein zejména v povrchových vrstvách nádoru u 13 nemocných. Nekrózu jsme našli pouze u tří UC a jednoho SCC. Jeden z těchto UC nádorů s nekrózou byl kompletně CA IX negativní, ostatní byly stejně výrazně pozitivní. Ani v jednom případě jsme nepozorovali vyšší intenzitu barvení v perinekrotické oblasti (Příloha 20, 21)

Statistickým hodnocením jsme nezjistili žádný významný rozdíl mezi skupinami WB+ a WB 0 v hodnotě G (Mann-Whitney test, $p=0.983$) a velikosti tumoru (Chi-square test, $p=0.259$).

Senzitivita, specifická, pozitivní prediktivní hodnota a negativní prediktivní hodnota pro CA IX v séru, moči a obě skupiny dohromady je uvedena v příloze 22.

5. Diskuze

Zdá se, že CA IX protein hraje důležitou úlohu v patogenezi mnoha karcinomů u lidí. K jeho expresi na membránách nádorových buněk dochází v důsledku hypoxie (inaktivace VHL genu a šupregulace dalších proteinů jako HIF, VEGF atd.). Tento membránový protein lze poměrně snadno detekovat na povrchu nádorových buněk v preparátu pomocí IHC barvení specifickou monoklonální protilátkou mAb M75. V literatuře je uváděna přítomnost CA IX téměř u 100 % karcinomů ledviny (18, 19) a dále u uroteliálních nádorů vývodných cest močových (45). Předpokládali jsme, že by mohlo docházet k uvolnění tohoto antigenu do okolních tkáňových tekutin. K ověření tohoto předpokladu jsme použili standardní nádorové buněčné linie obsahující velké množství CA IX proteinu na svých buněčných cytoplazmatických membránách. Na základě naší práce jsme měli ke stanovení CA IX proteinu k dispozici pouze jednu známou monoklonální protilátku M75, její epitop je lokalizovaný v PG doméně. Tou jsme spolehlivě prokázali přítomnost vysokých koncentrací CA IX v buněčných extraktech, která se zobrazovala metodou western blot jako dva proušky o molekulové hmotnosti 58 a 54 kDa. Také v kultivačním médiu experimentálních buněčných linií a také krátkodobě působících RCC buněčných kultur je s-CA IX v poměrně vysokých koncentracích. Vzniká zřejmě odštěpením extracelulární části molekuly do kultivačního média a tkáňových tekutin vlivem membránových proteáz. Proto je tato solubilní forma menší a zobrazuje se jako dva pruhy o molekulové hmotnosti 54 a 50 kDa. Tato velikost odpovídá proteoglykanové a karboanhydrázové doméně (9).

Problém nastal při stanovování s-CA IX v tkáňových tekutinách, kde jsou jeho koncentrace velmi nízké (1000x nižší než v médiu z nádorových kultur). V tomto případě se kromě specifických zón CA IX zobrazovaly i zkrácené reagující molekuly o molekulové hmotnosti 92 a 125 kDa, které znemožňovaly hodnocení (Příloha 23).

Příčinou tohoto jevu bylo to, že jsme museli používat jedinou dostupnou protilátku, specifickou proti jedinému epitopu, jak ke koncentraci antigenu ze vzorku krve nebo moče tak i k vizualizaci. K odstranění tohoto neřádného jevu bylo nutné získat nejméně další jednu specifickou, nejlépe monoklonální protilátku, namířenou proti jinému epitopu proteinu CA IX než je mAb M75. K vývoji nových myších protilátek byla důležitá znalost sekvence genu Car9, který je homologem lidského CA9 genu. Ta ukázala, že N-terminální, proteoglykanové domény (PG) CA IX proteinu jsou odlišné u lidí a myši. Naopak doména karboanhydrázy (CA) je vývojově

konzervativní. Proto myšička rozeznává lidskou PG doménu jako cizí a produkuje proti ní protilátky. Naopak nerozeznává CA doménu. Tento problém byl překonán vytvořením myšičky bez genu Car9 technikou *knock-out* (48). Pro ni je jakýkoliv CA IX protein cizí, lidský jako myšička, a produkuje proto protilátky proti různým antigenním místům CA IX. Pomocí této myšičky bez Car genu bylo možné vytvořit řadu monoklonálních protilátek, z nichž každá je specifická proti antigenním sekvencím, lokalizovaným v CA doméně (72). V práci jsme pak použili takto vytvořenou mAb V-10 ke koncentraci CA IX antigenu a M75 s navázanou peroxidázou k vizualizaci. Tím se podařilo odstranit nežádoucí, zkrácené reagující molekuly, znemožnilo jejich hodnocení (Příloha 24).

Akoliv *in vitro* nádorové buňky nebo fragmenty nádoru produkují poměrně vysokou koncentraci CA IX, v celém organismu pacientů s velkými nádory je tohoto antigenu velice málo. Jeho koncentrace je přibližně 100x nižší než jakou známe u jiných lidských markerů, jako PSA nebo CEA. Musíme proto předpokládat, že existují mechanismy, které rychle odstraňují s-CA IX protein z lidského organismu. Jedním z nich je vylučování s-CA IX v neznámé formě. Koncentrace s-CA IX proteinu u RCC pacientů v moči přibližně odpovídají koncentracím v krvi (Příloha 14). Pozitivita s-CA IX v moči je o něco nižší. Využití moči by bylo výhodnější pro možnost většího objemu materiálu, menší invazivnosti a přítomnosti menšího množství proteinu. Druhá možnost je, že se část s-CA IX proteinu degraduje v krvi na menší fragmenty o 20-30 kDa, pro jejichž stanovení nemáme v současnosti vhodnou metodu. Velkým problémem v této části výzkumu byly velmi nízké koncentrace s-CA IX proteinu v séru i moči, v řádu několika pikogramů, které jsou na hranici citlivosti současných metod. Proto všechny výsledky jsou stanoveny ze vzorků krve (1ml) a moče (10 ml) po imunoprecipitaci pomocí western blotu v kombinaci s potencionovanou chemiluminiscencí. Výhodou této metody je dostatečná citlivost, naopak nevýhodou je, že je pouze metodou semikvantitativní a velmi pracnou, nevhodnou pro hodnocení většího počtu vzorků.

Velice nízká koncentrace CA IX v tělních tekutinách pacientů s nádory (hlavně RCC), představuje v naší laboratoři zásadní technickou potíže (73). Tento problém se řeší i v jiných ústavech majících mnohem větší zkušenosti s diagnostikou nádorových markerů. Hlavní snahou je vypracovat test ELISA pro diagnostiku s-CA IX. Jejich výsledky vypadají značně slibně, nebo dokonce přesvědčivě, ale vyřadily by si

soustavnou kritickou porovnávací studii navzájem, jakof i s naším detekčním systémem (74, 75).

Než se dostaneme do této problematiky, přináší skupina Li Y. a spol., 2009. Ti, používající diagnostické reagenty od dvou firem (R&D Systems a Novus Biologicals) a našim protilátku M75 zjistili, že s antigenem CA IX plně specificky reaguje jen mAb M75, zatímco králičí polyklonální protilátka NB100 kromě antigenu CA IX dává ještě zkříženou reakci s jinými, dosud neidentifikovanými buněčnými antigeny. Je zvláště zajímavé, že tyto antigeny rovněž vykazují dvojistou zónu p 54/58. Navíc zjistili nový, cenný technický poznatek, že desferoxamin (DFO) indukuje v nádorových buňkách shodné biochemické pochody jako hypoxie. Tím se lze v dalších studiích vyhnout nákladným inkubátorům s regulovatelnou koncentrací O₂ (76)

Protože se nezdálo vhodnou metodou kvantifikovat s-CA IX protein u nemocných s RCC, soustředili jsme se v dalších experimentech na uroteliální karcinomy močového měchýře a vývodných močových cest. Předpokládali jsme, že výhodou pro stanovení s-CA IX proteinu u těchto nádorů je, že jsou přímo omývány močí a že nejvíce nádorových buněk, exprimujících CA IX protein je lokalizovaných na povrchu nádoru. Pravděpodobnost ztráty s-CA IX je tím minimální a jsme její schopni detekovat v moči i u malých nádorů (45). Předpokládá se, že expresce CA IX v nádorových buňkách je důsledkem fokální hypoxie, která indukuje ektopickou syntézu CA IX (77, 78, 42, 79). U UC je situace poněkud odlišná. Při IHC se CA IX protein často barvil difúzně v povrchových vrstvách nádorových papilárních struktur. To lze vysvětlit jednak nízkou tenzí kyslíku v oblasti relativně vzdálené od vaskulárního zásobení ve stromatu nádoru a dále také v moči. Kompletní IHC negativita jednoho UC s fokální nekrózou může být důsledkem jiné biologické povahy nádoru s neschopností exprese CA IX. Z výsledků lze předpokládat, že u nemocných s RCC s-CA IX cirkuluje v krvi. Protože je buněčný adhezivní protein (49, 80), je vázán v tkáních, které exprimují předpokládaný CA IX specifický receptor. Navázaný CA IX protein je poté v buňkách rozložen. Menší část je vyloučena do moči. U nemocných, kde jsme stanovili vysoké koncentrace s-CA IX, lze předpokládat, že v tkáni receptor byla obsazena s-CA IX proteinem a novotvořený zůstával volný v krvi a byl i ve vysoké koncentraci vyloučen. Naopak u UC je s-CA IX téměř výhradně uvolněn do moče. Jeho přítomnost v krvi brání u superficiálních tumorů bazální membrána, oddávající nádorové buňky od cév. To vysvětluje nepřítomnost s-CA IX v krvi.

Závěr

Zhodnocením dosažených výsledků jsme zjistili, že:

- 1) Dochází k uvolnění s-CA IX do média během kultivace CA IX pozitivních nádorových buněk experimentálních kultur.
- 2) Solubilní forma CA IX je menší o intracytoplasmatický úsek a transmembránovou oblast. Na Western blotu se zobrazuje jako dva proušky o molekulové hmotnosti 54 a 50 kDa proti CA IX, která má molekulovou hmotnost 58 a 54 kDa.
- 3) Koncentrace s-CA IX v kultivačním médiu experimentálních kultur se pohybují mezi 20-50 ng/ml.
- 4) Krátkodobě přechvávající kultury lidských RCC uvolní CA IX jako s-CA IX do kultivačního média ve stejné koncentraci jako stabilní linie nádorových buněk.
- 5) Solubilní CA IX (s-CA IX) je stanovitelná v RCC souboru v séru u 74,3 % a v moči u 63,3 %. V UC skupině v moči byla zjištěna s-CA IX u 69,6 % pacientů avšak v séru jsou u této skupiny koncentrace s-CA IX u superficiálních nádorů negativní.
- 6) Po chirurgickém odstranění nádoru ledviny dochází k rychlému poklesu koncentrace s-CA IX v séru s poločasem 1-2 dny.
- 7) U RCC ani u UC velikost nádoru a grade statisticky významně neovlivňuje koncentraci s-CA IX v séru a moči. Bohužel z výše citovaných technických důvodů je hodnocení zatíženo chybou malých souborů.
- 8) s-CA IX není detekovatelná v krvi nebo séru zdravých dobrovolníků.
- 9) K vhodnosti s-CA IX jako markeru RCC a UC se nelze z této práce vyjádřit. K nalezení odpovědi je nutné modifikovat vhodnou kvantitativní rutinní metodu ke stanovení s-CA IX a statisticky vyhodnotit v těchto souborech nemocných.

Souhrn

Práce se zabývá studiem karbonické anhydrázy IX, která je přítomna na membránách buněk v kterých urologických nádorů , jako možného nádorového markeru.

Cílem studie bylo především: 1) vytvořit uvolněnou solubilní formu karbonické anhydrázy IX z buněk stabilních nádorových linií a z krátkodobých kultur lidských nádorů do kultivačního média, 2) stanovit koncentrace s-CA IX v tělních tekutinách u nemocných s RCC a UC, 3) zhodnotit vliv velikosti nádoru nebo gradeu na koncentrace s-CA IX a 4) pokusit se zhodnotit možnost využití stanovení s-CA IX jako možného markeru těchto nádorů .

Vytvořili jsme dvě skupiny: 1. nemocní s RCC, 2. nemocní s UC vývodných močových cest. V obou skupinách byly kromě pacientů s příslušnými nádory testovány kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků a nemocných s nenádorovými onemocněními urogenitálního traktu a non-RCC nádory. U všech nemocných byla hodnocena velikost nádoru rtg zobrazovacími metodami (sono, CT, NMR), endoskopicky nebo změřením tumoru při patologickém vyšetření preparátu. K prokázání CA IX antigenu ve vzorcích nádorů jsme použili imunohistochemické barvení pomocí monoklonální protilátky MAb M75. V extraktech z nádorů a tělních tekutinách jsme koncentraci CA IX a s-CA IX stanovovali metodou western blot nebo ELISA.

Výsledky: V 1. skupině jsme v séru zjistili s-CA IX pouze v podskupině s prokázaným RCC. Z 35 vzorků jich bylo 26 (74,3 %) pozitivních. V množství v podskupině s RCC byl s-CA IX protein prokázán u 19 (63,3 %) z 30 vzorků . V kontrolní skupině byly všechny vzorky s-CA IX negativní.

Ve 2. skupině byl UC histologicky prokázán u 23 nemocných. Pozitivní nález s-CA IX v množství byl u 16 z nich (69,6%). Falešně negativní nález s-CA IX byl u 7 (30,4%) nemocných. Sérové koncentrace s-CA IX byly u všech UC pozitivních negativní. V kontrolní skupině byly všechny vzorky stejně jeden negativní. Vliv velikosti nádoru nebo jeho gradeu na koncentrace s-CA IX jsme neprokázali.

Zhodnocením dosažených výsledků jsme zjistili, že:

- 1) Dochází k uvolnění s-CA IX do média během kultivace CA IX pozitivních nádorových buněk v experimentálních kulturách. Tato solubilní forma CA IX je menší o intracytoplasmatický úsek a transmembránovou oblast. Na Western

blotu se zobrazuje jako dva proušky o molekulové hmotnosti 54 a 50 kDa proti CA IX, která má molekulovou hmotnost 58 a 54 kDa.

- 2) Koncentrace s-CA IX v kultivačním médiu experimentálních kultur se pohybují mezi 20-50 ng/ml.
- 3) Krátkodobě přiváděcí kultury lidských RCC uvolňují CA IX jako s-CA IX do kultivačního média ve stejné koncentraci jako experimentální kultury.
- 4) Solubilní CA IX je stanovitelná v RCC souboru v séru u 74,3 %, v moči u 63,3 % pacientů a v UC skupině v moči u 69,6 % pacientů. V séru jsou u této skupiny koncentrace s-CA IX negativní.
- 5) Po chirurgickém odstranění nádoru ledviny dochází k rychlému poklesu koncentrace s-CA IX v séru s poločasem 1-2 dny.
- 6) U RCC velikost nádoru a grade statisticky významně neovlivňuje koncentraci s-CA IX v tkáňových tekutinách. U UC mnohem menší nádory (ve srovnání s RCC) produkují do moči prokazatelné množství s-CA IX, nebo antigen se neztrácí v krevním oběhu ani při filtraci ledvinami. Velikost a grade opět významně neovlivňují koncentraci s-CA IX v moči. Bohužel z výše citovaných technických důvodů je hodnocení zatíženo chybou malých souborů.
- 7) s-CA IX není detekovatelná v krvi nebo séru zdravých dobrovolníků.
- 8) K vhodnosti s-CA IX jako markeru RCC a UC se nelze z této práce vyjádřit. K nalezení odpovědi je nutné modifikovat vhodnou kvantitativní rutinní metodu ke stanovení s-CA IX a statisticky vyhodnotit v těchto souborech nemocných.

Poděkování

Děkuji RNDr. J. Závadovi, DrSc a RNDr. Z. Zavadové z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za metodické vedení, zpracování vzorků a recenzi rukopisu.

Dále děkuji svému školiteli docentu MUDr. Ivanu Kawaciukovi, CSc. a profesoru MUDr. Marku Babjukovi, CSc. za odbornou pomoc a pomoc při zpracování této práce.

MUDr. M. Veselému, PhD. z Urologické kliniky UK 2.LF a FNM, Praha děkuji za statistické zpracování výsledků a MUDr. P. Křapovi z Kliniky patologie a molekulární medicíny UK 2.LF a FNM, Praha za mikroskopická hodnocení preparátů.

Obrázky 1 a 2 byly převzaty a upraveny z práce Pastoreková S., Závada J: Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy publikované v Cancer Therapy, 2004, 2, 245-262, se svolením autorů.

Použitá literatura

1. Kaučič J: Rádioimunoanalýza v onkologii. Veda, vydavatelstvo SAV, 1991
2. Dienstbier Z: Možnosti nádorové diagnostiky za použití tzv. nádorových markerů. Praktický lékař 1993;73:434-435
3. Tripp BC, Smith K, Ferry JG: Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. J Biol Chem 2001;276:48615-48618
4. Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran C.T: Carbonic anhydrases: Current state of the art, therapeutic applications and future prospects. J Enz Inhib Med Chem 2004;19:199-229
5. Zavada J, Zavadová Z, Malir A, Kocent A: VSV pseudotype produced in cell line derived from human mammary carcinoma. Nature New Biol 1972;240:124-125
6. Pastorekova S, Zavadová Z, Kostal M, Babusikova O, Závada J: A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. Virology 1992;187:620-626
7. Zavada J, Zavadova Z: An unusual transmissible agent of MaTu. Arch Virol 1991;118:185-197
8. Reiserova L, Kaluzova M, Kaluz S, Willis AC, Zavada J, Zavadovska E, Zavadova Z, Ciampor F, Pastorek J, Pastorekova S. Identification of MaTu as MX agent as a new strain of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and serological indication of horizontal spread of LCMV in human population. Virology 1999;257:73-83
9. Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A, Stanbridge EJ, Zavada J, Kettmann R, Pastorek J. Human MN/CA 9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. Genomics 1996;33:480-487
10. Hewett-Emmett D., Tashian R.E: Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. Mol Phylogenet Evol 1996;5:50-77
11. Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK, Opavský R, Zelnik V, Saarnio J, Pastorek J: Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: Analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. Gastroenterology 1997; 112:398-408
12. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Waheed A, Casey MC, Zhou XY, Pastoreková S, Pastorek J, Karttunen T, Haukipuro K, Kairaluoma MI, Sly WS.

- Immunochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *J Histochem Cytochem* 1998;46:497-504
13. Kivelä AJ, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivelä J, Parkkila AK, Pastoreková S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Rajaniemi H. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem Cell Biol* 2000;114:197-204
 14. Karhumaa P, Kaunisto K, Parkkila S, Waheed A, Pastoreková S, Pastorek J, Sly WS, Rajaniemi H. Expression of the transmembrane carbonic anhydrases, CA IX and CA XII, in the human male excurrent ducts. *Mol Hum Reprod* 2001;7:611-616
 15. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001;158:905-919
 16. Liao SY, Brewer C, Závada J, Pastorek J, Pastorekova S, Manetta A, Berman ML, DiSaia PJ, Stanbridge EJ. Identification of MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas. *Am J Pathol* 1994;145:598-609
 17. Liao SY, Stanbridge EJ. Expression of MN/CA9 protein in Papanicolaou smears containing atypical glandular cells of undetermined significance is a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and neoplasia. *Cancer* 2000;88:1108-1121
 18. Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 1997; 57: 2827-2831
 19. Oosterwijk E, Ruiters DJ, Hoedemaeker PJ, Pauwels EK, Jonas U, Zwartendijk J, Warnaar SO. Monoclonal antibody G250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int J Cancer* 1986;38:489-494
 20. Oosterwijk E, Debruyne FM. Radiolabeled monoclonal antibody G250 in renal-cell carcinoma. *World J Urol* 1995;13:186-190

21. Uemura H, Kitagawa H, Hirao Y et al. Expression of tumor-associated antigen MN/G250 in urologic carcinoma: Potential therapeutic target. *J Urol* 1997;157 (Suppl.):377
22. McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, Stifelman MD, Katz AE, Chen MW, Olsson CA, Sawczuk IS. Expression of the tumor-associated gene MN: A potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:2362-2365
23. Turner JR, Odze RD, Crum CP, Resnick MB. MN antigen expression in normal, preneoplastic, and neoplastic esophagus: A clinicopathological study of a new cancer-associated biomarker. *Hum Pathol* 1997;28:740-744
24. Vermylen P, Roufosse C, Burny A, Verhest A, Bosschaerts T, Pastorekova S, Ninane V, Sculier JP. Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic lesions in non-small-cell lung carcinoma. *Eur Respir J* 1999;14:806-811
25. Bartosová M, Parkkila S, Pohlodek K, Karttunen TJ, Galbavý S, Mucha V, Harris AL, Pastorek J, Pastoreková S. Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of cerbB2. *J Pathol* 2002;197:314-321
26. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Pastorekova S, Haukipuro K, Pastorek J, Juvonen T, Karttunen TJ. Transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA XI, is a potential biomarker for biliary tumors. *J Hepatol* 2001;35:643-649
27. Leppilampi M, Saarnio J, Tuomo J, Kivela J, Pastorekova S, Pastorek J, Waheeh A, Sly WS, Parkkila S. Carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in gastric Tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:1398-1403
28. Lieskovska J, Opavsky R, Zacikova L, Glasova M, Pastorek J, Pastorekova S: Study of in vitro conditions modulating expression of MN/CA IX protein in human cell lines derived from cervical carcinoma. *Neoplasma* 1999;46:17-24
29. Kaluz S, Kaluzova M, Opavsky R, Pastorekova S, Gibadulinova A, Dequiedt F, Kettmann R, Pastorek J. Transcriptional regulation of the MN/CA9 gene coding for the tumor-associated carbonic anhydrase IX. Identification and characterisation of a proximal silencer element. *J Biol Chem* 1999;274:32588-32595
30. Kaluzova M, Pastorekova S, Svastova E, Pastorek J, Stanbridge EJ, Kaluz S: Characterization of the MN/CA 9 promoter proximal region: a role for

- specificity protein (SP) and activator protein 1 (AP1) factors. *Biochem J* 2001;359:669-677
31. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 2000;60:7075-7083
 32. Epstein ACR, Gleadle JM, McNeil LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzén E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. *C. elegans* EGL-9 and mammalia homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 2001, 43-54
 33. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001;15:2675-2686
 34. Semenza G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:721-732
 35. Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, Stanbridge EJ, Lerman MI. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild type von Hippel-Lindau transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12596-12601
 36. Ashida S, Nishimori I, Tanimura M, Onishi S, Shuin T. Effects of von Hippel-Lindau gene mutation and methylation status on expression of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:561-568
 37. Jakubickova L, Biesova Z, Pastorekova S, Kettmann R, Pastorek J. Methylation of the CA9 promoter can modulate expression of the tumor-associated carbonic anhydrase IX in dense carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2005;26:1121-1127
 38. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Campo L, Chia SK, English R, Pastorek J, Sly WS, Ratcliffe PJ, Harris AL. Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am J Pathol* 2001;158:1011-1019
 39. Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, Barter KC, Ratcliffe PJ, Harris AL. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated

- marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3660-3668
40. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001;61:7992-7998
 41. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:3399-3403
 42. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wykoff CC, Pastorek J, Ratcliffe P, Stratford IJ, West CML. Carbonic anhydrase IX expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumour oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 2001;61:6394-6399
 43. Olive PL, Aquino-Parsons C, MacPhail SH, Laio SY, Raleigh JA, Lerman MI, Stanbridge EJ. Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Res* 2001;61:8924-8929
 44. Beasley NJP, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Barter K, Pastorek J, Cox GJ, Ratcliffe P, Harris AL. Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis and microvessel density. *Cancer Res* 2001;61:5262-5267
 45. Turner KJ, Crew JP, Wykoff CC, Watson PH, Poulson R, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Cranston D and Harris AL. The hypoxia-inducible genes VEGF and CA9 are differentially regulated in superficial vs invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 2002;86:1276-1282
 46. Swinson DE, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J, Taub N, Harris AL, O'Byrne KJ. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:473-82
 47. Vukovic V, Haugland HK, Nicklee T, Morrison AJ, Hedley DW. Hypoxia-inducible factor-1 is an intrinsic marker for hypoxia in cervical cancer xenografts. *Cancer Res* 2001;61:7394-7398

48. Ortova-Gut M, Parkkila S, Vernerová Z, Rohde E, Závada J, Höcker M, Pastorek J, Karttunen T, Gibadulinová A, Zavadová Z, Knobeloch KP, Wiedenmann B, Svoboda J, Horak I, Pastoreková S. Gastric hyperplasia in mice with targeted disruption of the carbonic anhydrase gene Car9. *Gastroenterology* 2002;123:1889-1903
49. Závada J, Zavadová Z, Pastorek J, Biesová Z, Jezek J, Velek J. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Brit J Cancer* 2000;82:1808-1813
50. de la Taille A, Katz A, Cao Y, McKiernan J, Buttyan R, Burchardt M, Burchardt T, Hayek O, Olsson CA, Chopin DK, Sawczuk IS. Blood-based RT-PCR assays of MN/CA9 or PSMA: Clinical application in renal cancer patients. *Urology* 2000;56: 393-398
51. Kawaciuk I: Prognóza karcinomu ledviny, Galén, Praha 2005
52. Aso Y, Homma Y: A survey on incidental renal cell carcinoma in Japan. *J Urol* 1992;147:340-343
53. Konnak JW, Grossman HB. Renal cell carcinoma as an incidental finding. *J Urol* 1985;134:1094-1096
54. Rodríguez-Rubio FI, Díez-Caballero F, Martín-Marquina A, Abad JI, Berián JM. Incidentally detected renal cell carcinoma. *Brit J Urol* 1996;78:29-32
55. Nakano E, Iwasaki A, Seguchi T, Kokado Y, Yoshioka T, Sugao H, Koide T. Incidentally diagnosed renal cell carcinomas. *Eur Urol* 1992;21:294-298
56. Hellsten S, Johnsen J, Berge T, Lindell F. Clinically unrecognised renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1990;18:2-3
57. Ozen H, Colowick A, Freiha FS. Incidentally discovered solid renal masses: what are they? *Brit J Urol* 1993;72:274-276
58. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin R, de Kernion JB, Beldegrun A. Renal cell carcinoma: Prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol* 2000;163:426-430
59. Thompson IM, Peek M. Improvement in survival of patients with renal cell carcinoma - the role of serendipitously detected tumor. *J Urol* 1988;140:487-490
60. Yamaguchi K, Tominaga T, Nishimura Y. Clinical study on incidental renal carcinoma. *Hinyokika-Kijo* 1995;41:93-99
61. Bretheau D, Lechevallier E, Eghazarian C, Grisoni V, Coulange C. Prognostic significance of incidental renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1995;27:319-323

62. Kawaciuk I, Hyršl L, Dusek P, Jarolim L, Schmidt M, Kaliska V, Chocholatý M, Vesely S. Influence of tumour-associated symptoms on the prognosis of patients with renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2008;42:406-11. IF 0.909
63. Mihara S, Kuroda K, Yoshioka R, Koyama W. Early detection of renal cell carcinoma by ultrasonographic screening: based on the results of 13 years screening in Japan. *Ultrasound Med Biol* 1999;25:1033-1039
64. Tsuboi N, Horiuchi K, Kimura G, Kondoh Y, Yoshida K, Nishimura T, Akimoto M, Miyashita T, Subosawa T. Renal masses detected by general health checkup. *Int J Urol* 2000;7:404-408
65. McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, de la Taille A, Stifelman MD, Emanuel ER, Bagiella E, Rubin MA, Katz AE, Olsson CA, Sawczuk IS. The detection of renal cell carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9. *Cancer* 1999;86:492-497
66. Gilbert SM, Whitson JM, Mansukhani M, Buttyan R, Benson MC, Olsson CA, Sawczuk IS, McKiernan JM. Detection of carbonic anhydrase-9 gene expression in peripheral blood cells predicts risk of disease recurrence in patients with renal cortical tumors. *Urology* 2006;67:942-5
67. Williams CB, Mitchell JP: Carcinoma of the ureter--a review of 54 cases. *Brit J Urol* 1973;45:377-387
68. van Rhijn BWG, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 2005;47:736-748
69. Babjuk M, Kostirová M, Mudra K, Pecher S, Smolova H, Pecen L, Ibrahim Z, Dvoracek J, Jarolim L, Novak J, Zima T. Qualitative and quantitative detection of urinary human complement factor H-related protein (BTA stat and BTA TRAK) and fragments of cytokeratins 8, 18 (UBC rapid and UBC IRMA) as markers for transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2002;41:34-39.
70. Vrooman OPJ, Witjes A. Urinary markers in Bladder Cancer. *Eur Urol* 2008; 53:909-916
71. Tijssen P. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Elsevier, Amsterdam, 1985
72. Zatořovicová M, Tarábková K, Svastová E, Gibadulinová A, Mucha V, Jakubíčková L, Biesová Z, Rafajová M, Ortova Gut M, Parkkila S, Parkkila AK,

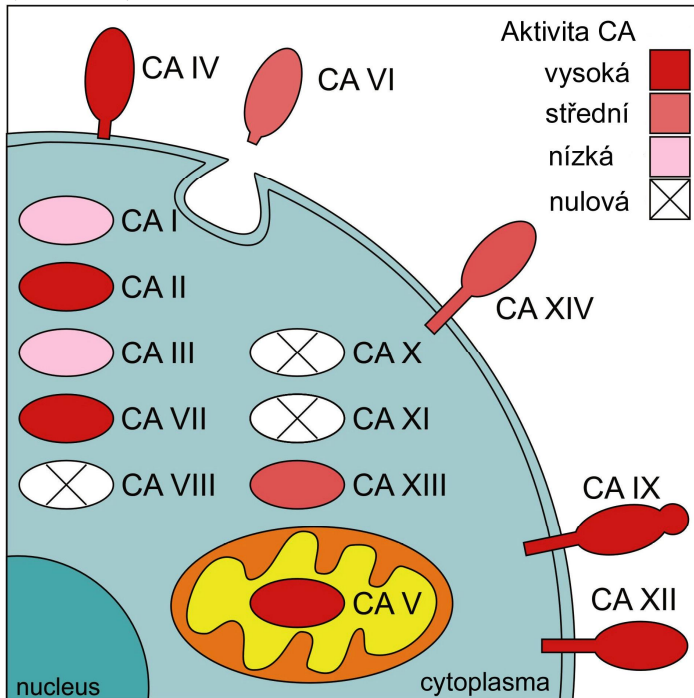
- Waheed A, Sly WS, Horak I, Pastorek J, Pastoreková S. Monoclonal antibodies generated in carbonic anhydrase IX deficient mice recognize different domains of tumor-associated hypoxia-induced carbonic anhydrase IX. *J Immunol Meth* 2003;282:117-134
73. Zavada J, Zavadova Z, Zatovicova M, Hyrsl, Kawaciuk I: Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Brit J Cancer* 2003;89:1067-1071
74. Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J. Serum carbonic anhydrase IX level is associated with postoperative recurrence of conventional renal cell cancer. *J.Urol* 2008;180:510-514
75. Zhou GX, Ireland J, Rayman P, Finke J, Zhou M. (2010) Quantification of carbonic anhydrase IX expression in serum and tissue of renal cell carcinoma patients using enzyme-linked immunosorbent assay: Prognostic and diagnostics protocols. *Urology* 2010;75:257-261
76. Li Y, Wang H, Oosterwijk E, Selman Y, Mira JC, Medrano T, Shiverick KT, Frost S. Antibody specific detection of CA IX in breast and prostate cancers. *Biochim Biophys Res Comm* 2009;386:488-492
77. Pastorekova S, Zavada J. Carbonic anhydrase (CA IX) as a potential target for cancer therapy. Review article. *Cancer Ther* 2004;2:245-262
78. Pastorekova S, Parkkila S, Zavada J. Tumor associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem* 2006;42:167-216
79. Harris AL. Hypoxia is a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer* 2002;2:38-47
80. Zavadova Z, Zavada J. Carbonic anhydrase IX (CA IX) mediates tumor cell interactions with microenvironment. *Oncol Reports* 2005;13:977-682

Seznam p íloh

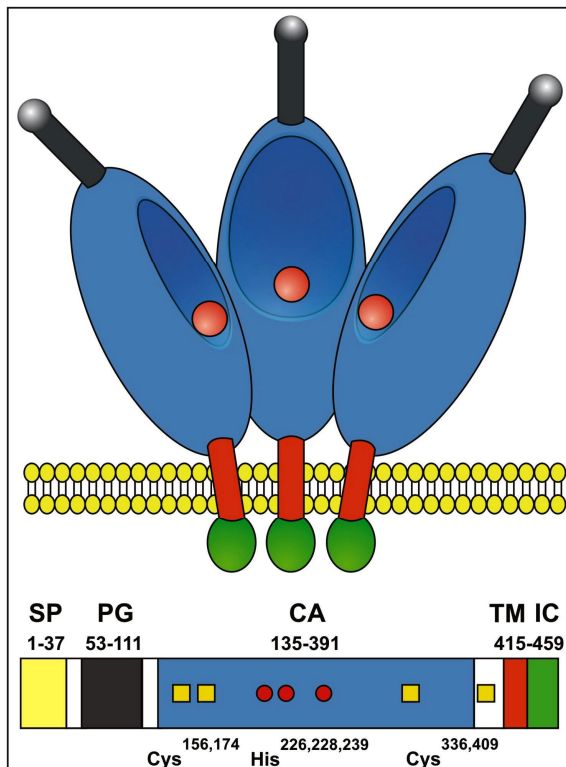
- P íloha . 1:** Rozd ělení karbonických anhydráz dle lokalizace a CA aktivity (obrázek)
- P íloha . 2:** Struktura CA IX. SP - signální peptid, PG - proteoglykanová doména, CA ó doména karbonické anhydrázy, TM ó transmembránová oblast, IC ó intracelulární segment. (obrázek)
- P íloha . 3:** RCC (C64) ó incidence a mortalita. Zdroj ÚZIS, Praha 2008. (graf)
- P íloha . 4:** Uroteliální karcinom mo ového m chý e (C67) ó incidence a mortalita. Zdroj ÚZIS, Praha 2008.(graf)
- P íloha . 5:** Tabulka 1: P ehled UC marker , senzitivita, specificita, výhody, nevýhody. (tabulka)
- P íloha . 6:** Zastoupení proband ů v souboru RCC. (graf)
- P íloha . 7:** Graf 4: Zastoupení proband ů v souboru UC. (graf)
- P íloha . 8:** Zastoupení pT kategorií v podskupin ě RCC. (graf)
- P íloha . 9:** Zastoupení G kategorií v podskupin ě RCC. (graf)
- P íloha . 10:** Western blot, stanovení CA IX v bun ěném extraktu a kultiva ním médiu RCC a kontrolních tkání. HT29: M = médium, C = bun ěný extrakt. K1, K2 = kontroly, . 27 = angiomyolipom, ostatní RCC. (obrázek)
- P íloha . 11:** CA IX protein z kultiva ního média krátkodobých kultur RCC (dv ě r zné protilátky). HT 29 ó bun ěná linie ca coli, M ó médium, C ó bun ěný extrakt, 1-6 ó médium z krátkodobých RCC kultur. (obrázek)
- P íloha . 12:** CA IX protein v séru RCC nemocných. (obrázek)
- P íloha . 13:** s-CA IX v séru nemocných p ed a po nefrektomii (B=p ed, A=po nefrektomii). (obrázek)
- P íloha . 14:** Koncentrace CA IX a s-CA IX v r ůzných materiálech. (tabulka)
- P íloha . 15:** Senzitivita, specificita, PPV a NPV pro CA IX v souboru RCC. (tabulka)
- P íloha . 16:** Zastoupení pT kategorií v podskupin ě UC. (graf)
- P íloha . 17:** Zastoupení G kategorií v podskupin ě UC. (graf)
- P íloha . 18:** Koncentrace s-CA IX v mo i v souboru nemocných s histologicky prokázaným UC a zdravých kontrol. (graf)
- P íloha . 19:** Porovnání výsledk ů mikroskopického vy-ět ění (barvení hematoxylinem-eosinem), imunohistochemického vy-ět ění CA IX (IHC) a western blot (WB). (tabulka)
- P íloha . 20:** UC mo ového m chý e, grade 2 (zv ět ění 200x), barvení hematoxylin-eosin. (obrázek)
- P íloha . 21:** UC mo ového m chý e, grade 2 (zv ět ění 200x), imunohistochemické barvení na CAIX, barví se hlavn ě v povrchových ástech papilárních nádorových struktur (skóre 2). (obrázek)
- P íloha . 22:** Senzitivita, specificita, PPV a NPV pro s-CA IX v souboru UC. (tabulka)
- P íloha . 23:** CA IX protein ze séra RCC nemocných a zdravých kontrol (jedna protilátka). (obrázek)
- P íloha . 24:** CA IX protein koncentrovaný ze séra RCC nemocných (dv ě r zné protilátky). (obrázek)

Přílohy

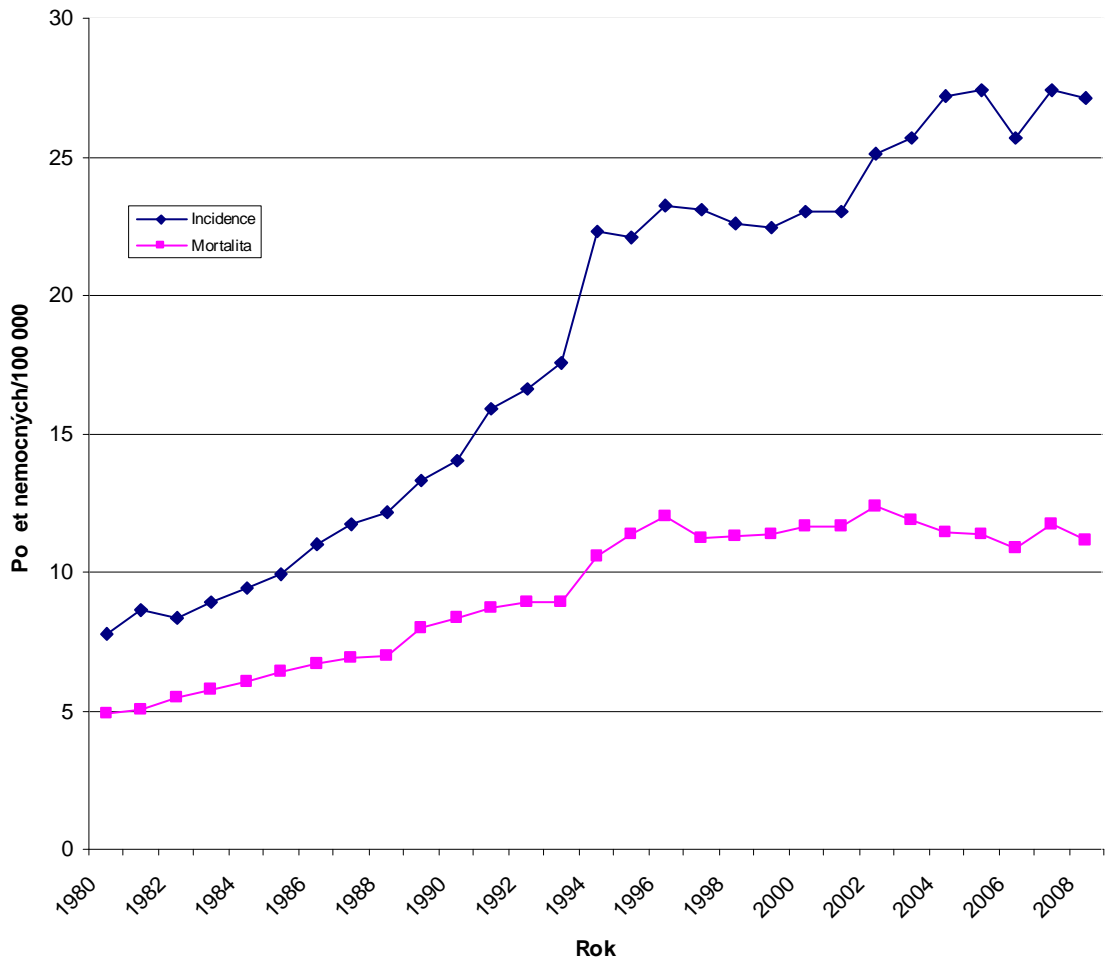
Příloha . 1: Rozdělení karboxických anhydráz dle lokalizace a CA aktivity (obrázek)



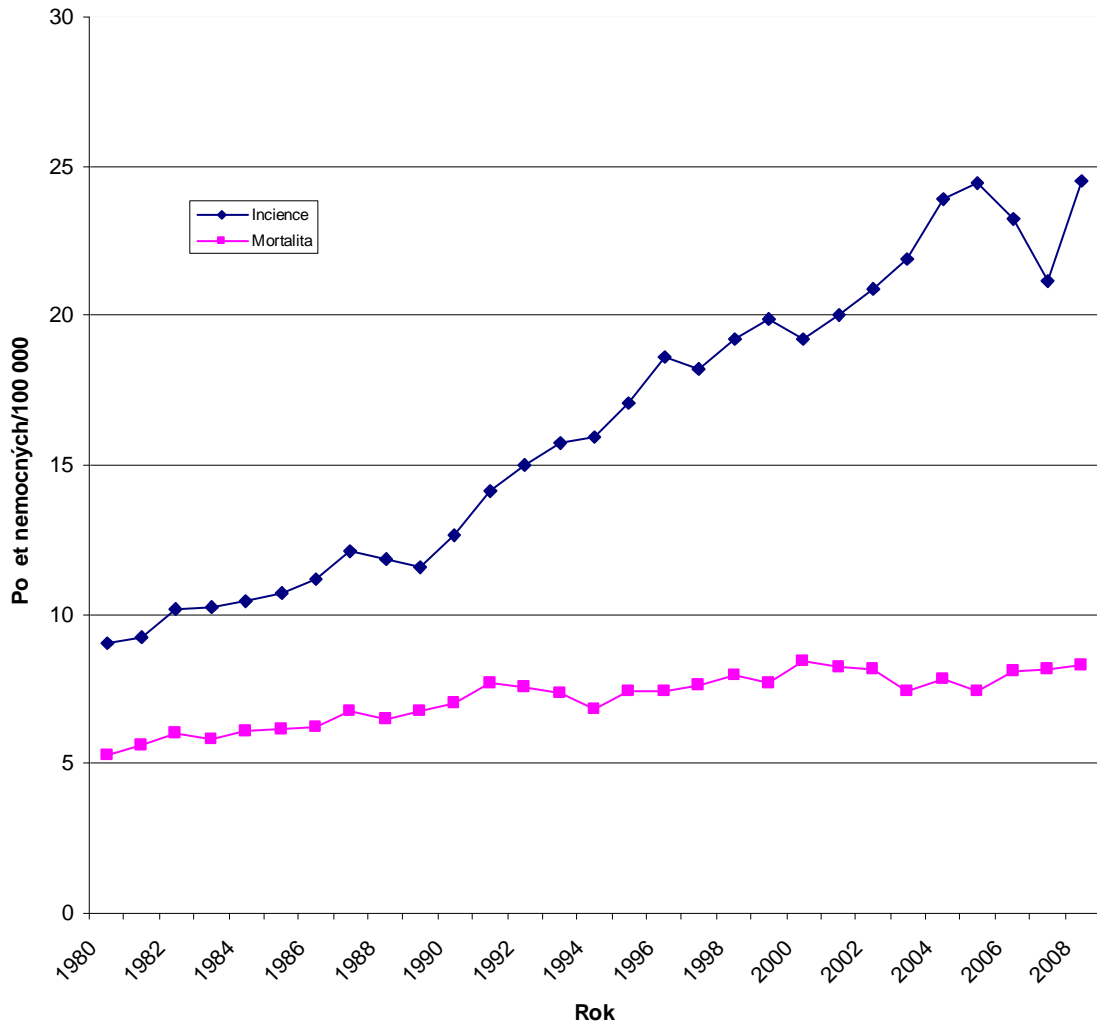
Příloha . 2: Struktura CA IX. SP - signální peptid, PG - proteoglykanová doména, CA ó doména karboxické anhydrázy, TM ó transmembránová oblast, IC ó intracelulární segment. (obrázek)



Příloha 3: RCC (C64) – incidence a mortalita. Zdroj ÚZIS, Praha 2008. (graf)



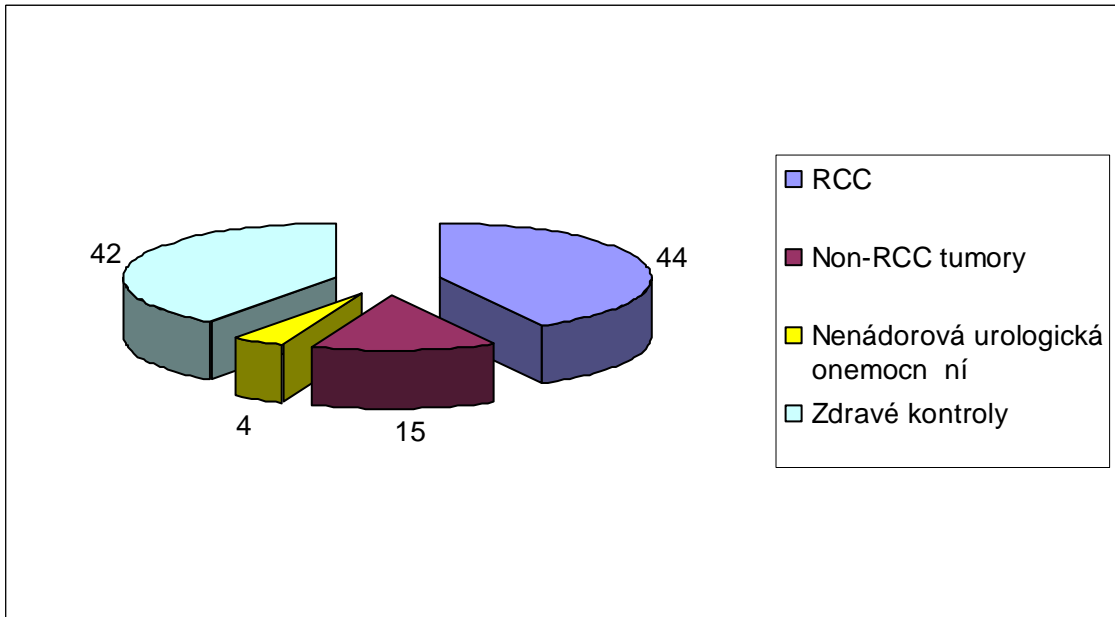
Příloha . 4: Uroteliální karcinom močového měchýře (C67) – incidence a mortalita. Zdroj ÚZIS, Praha 2008.(graf)



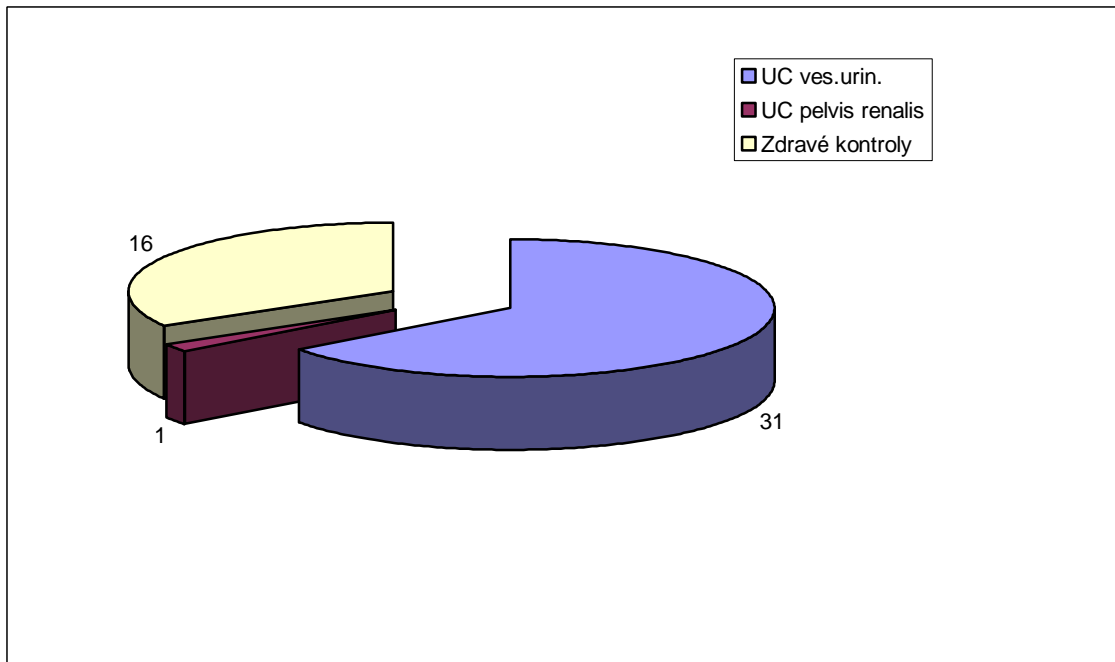
**Příloha . 5: Přehled UC markerů, senzitivita, specificita, výhody, nevýhody.
(tabulka)**

Marker	Senzitivita (%)	Specificita (%)	Výhody	Nevýhody
FISH	69-87	89-96	BCG neovlivňuje	Drahá, náročná provedením
MSA	72-97	80-100	Detekce i low-grade tumor	Drahá, náročná provedením
ImmunoCyt	38,5-100	73-84,2		Vysoká variabilita hodnocení
Telomeráza	70-100	60-70	Senzitivita	Ovlivněna zářením, v kěm
BTA-TRAK	24-89	52-93		Ovlivněna benign. genitourin. onemocněními
BTA-stat	57-79	48-95	On bench test	Ovlivněna benign. genitourin. onemocněními
HA, HA-Eza	83-94	77-93,4	Detekce i low-grade tumor	Nutné další studie
NMP22	49,5-65	40-87,3	Neovlivněna BCG, detekce i low-grade tumor	Nejasně definována normální hodnota
BLCA-4	89-96,4	95-100	Senzitivita, specificita	Nutné další studie
CYFRA 21-1	43-79,3	68-84		Ovlivněna benign. genitourin. onemocněními, i. ves. terapií
Survivin	64-94	93-100	Senzitivita, specificita	Nutné další studie

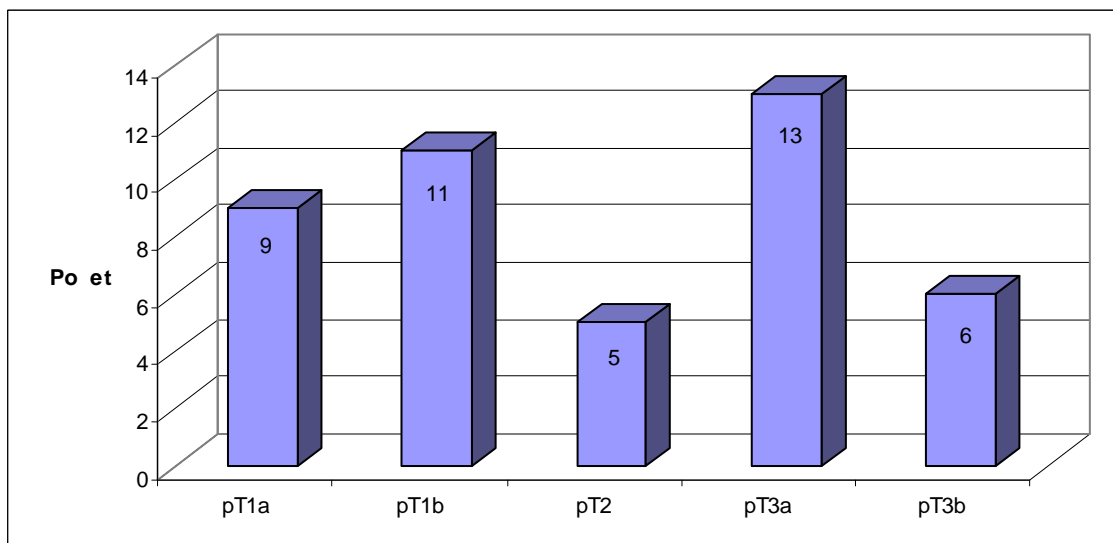
Příloha 6: Zastoupení probandů v souboru RCC. (graf)



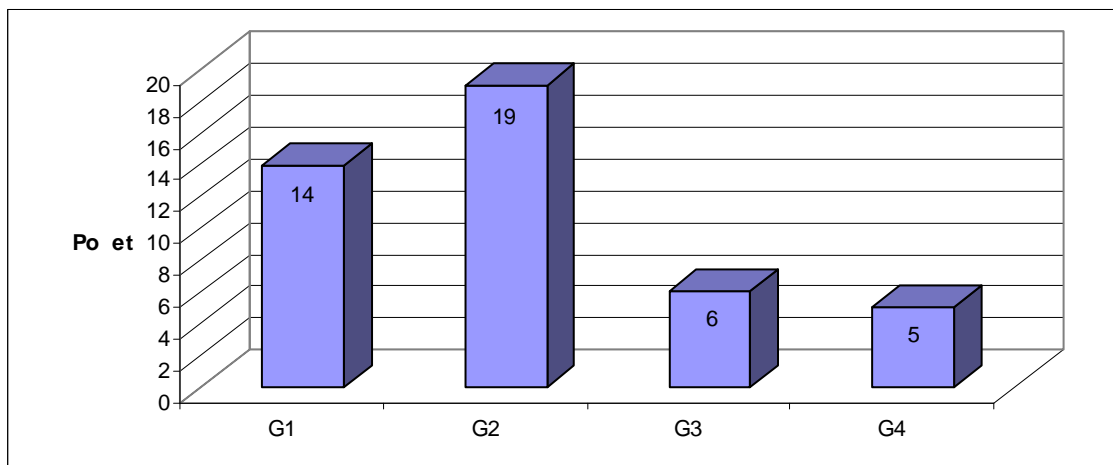
Příloha 7: Zastoupení probandů v souboru UC. (graf)



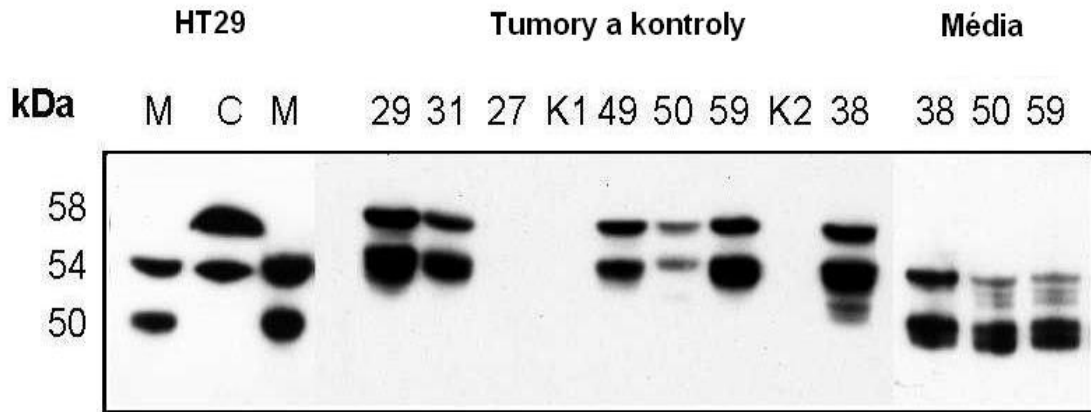
Příloha .8: Zastoupení pT kategorií v podskupině RCC. (graf)



Příloha .9: Zastoupení G kategorií v podskupině RCC. (graf)



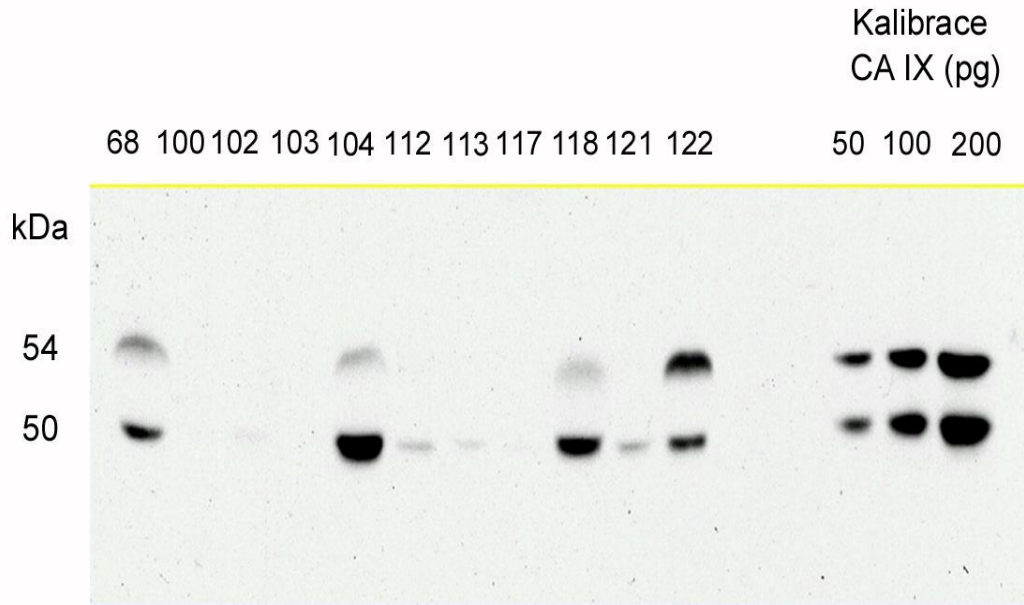
**P íloha . 10: Western blot, stanovení CA IX v bun ném extraktu a kultiva ním
médiu RCC a kontrolních tkání. HT29: M = médium, C = bun ý extract. K1, K2
= kontroly, . 27 = angiomyolipom, ostatní RCC. (obrázek)**



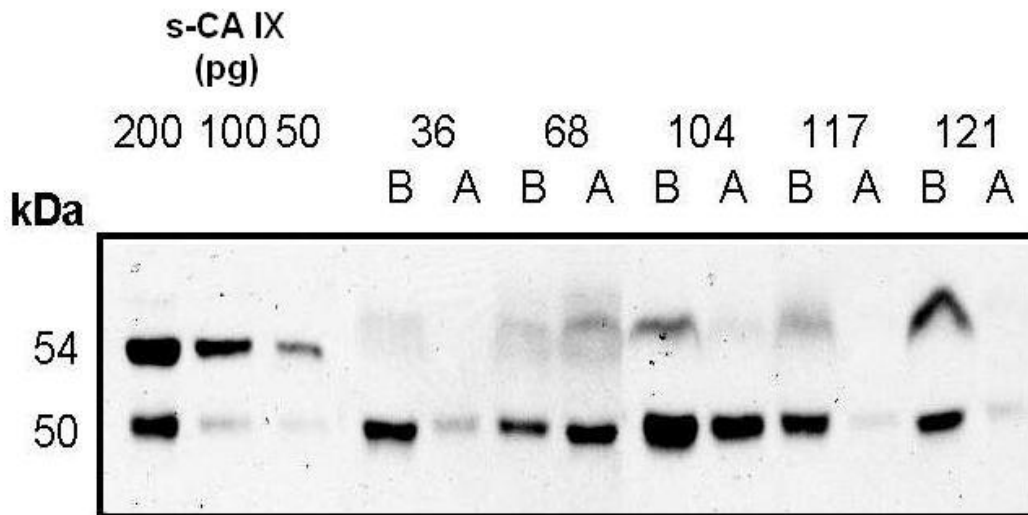
**P íloha . 11: CA IX protein z kultiva ního média krátkodobých kultur RCC (dv
r zné protilátky). HT 29 ó bun ná linie ca coli, M ó médium, C ó bun ý
extract, 1-6 ó médium z krátkodobých RCC kultur. (obrázek)**



Příloha . 12: CA IX protein v séru RCC nemocných. (obrázek)



Příloha . 13: s-CA IX v séru nemocných před a po nefrektomii (B=před, A=po nefrektomii). (obrázek)



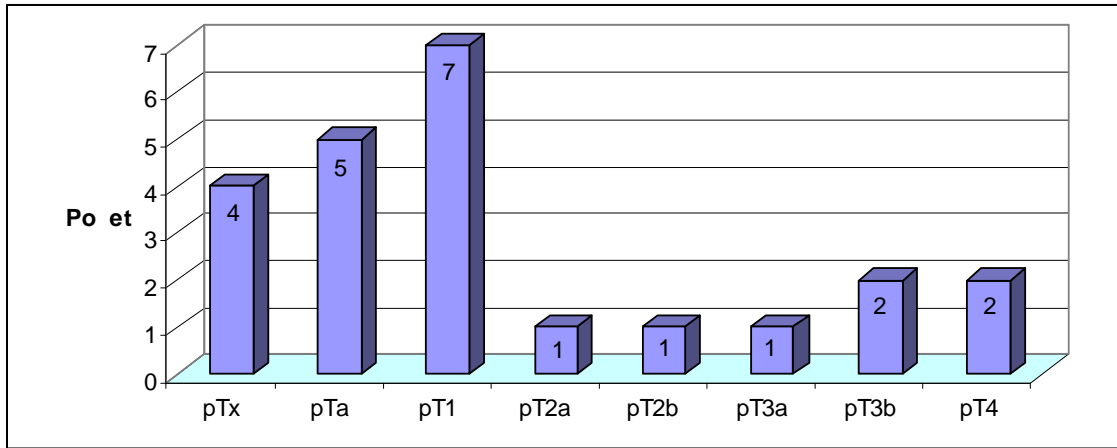
Příloha . 14: Koncentrace CA IX a s-CA IX v různých materiálech. (tabulka)

Materiál	Koncentrace CA IX a s-CA IX
HT29 buněčný extrakt	4 mgg ⁻¹ celkové bílkoviny
první extrakt RCC	0,5 - 2 mgg ⁻¹ celkové bílkoviny
Extrakt normální ledviny	nedetekovatelný
HT29 TC medium	20 - 50 ngml ⁻¹
RCC TC media	20 - 50 ngml ⁻¹
Séra RCC pacient	20 pg - 3,6 ngml ⁻¹
Kontrolní séra	5-25 pgml ⁻¹
Mo RCC pacient	20 pg - 3 ngml ⁻¹
Kontrolní mo	0 - 2 pgml ⁻¹

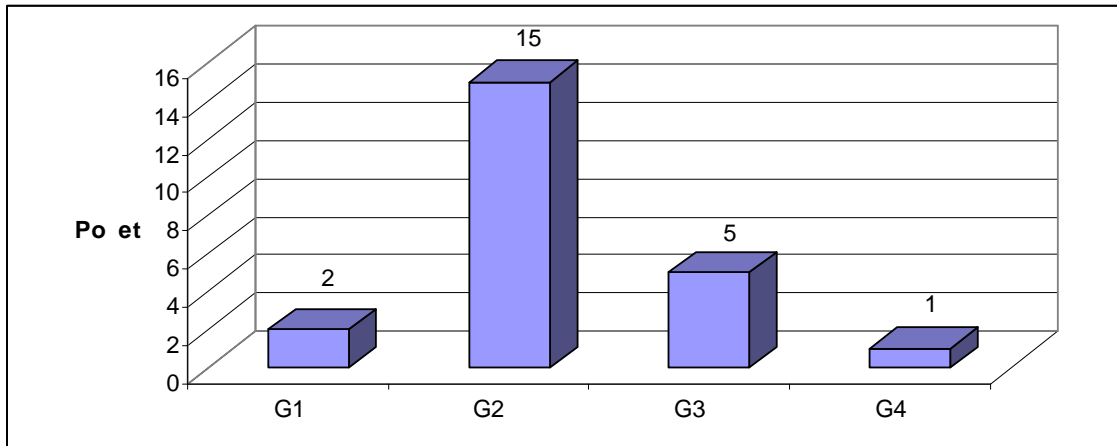
Příloha . 15: Senzitivita, specificita, pozitivní prediktivní hodnota (PPV) a negativní prediktivní hodnota (NPV) pro CA IX v souboru RCC. (tabulka)

	CA IX sérum	CA IX mo	CA IX sérum+mo
Senzitivita	60%	44%	77%
Specificita	100%	100%	100%
PPV	100%	100%	100%
NPV	18%	14%	28%

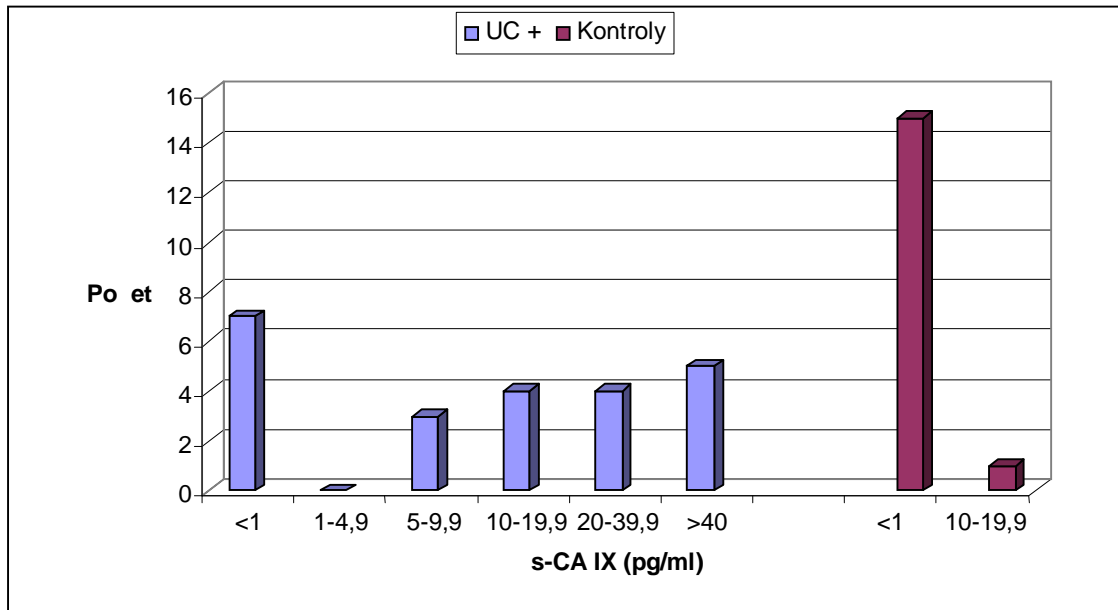
Příloha .16: Zastoupení pT kategorií v podskupině UC. (graf)



Příloha .17: Zastoupení G kategorií v podskupině UC. (graf)



Příloha . 18: Koncentrace s-CA IX v moči v souboru nemocných s histologicky prokázaným UC a zdravých kontrol. (graf)



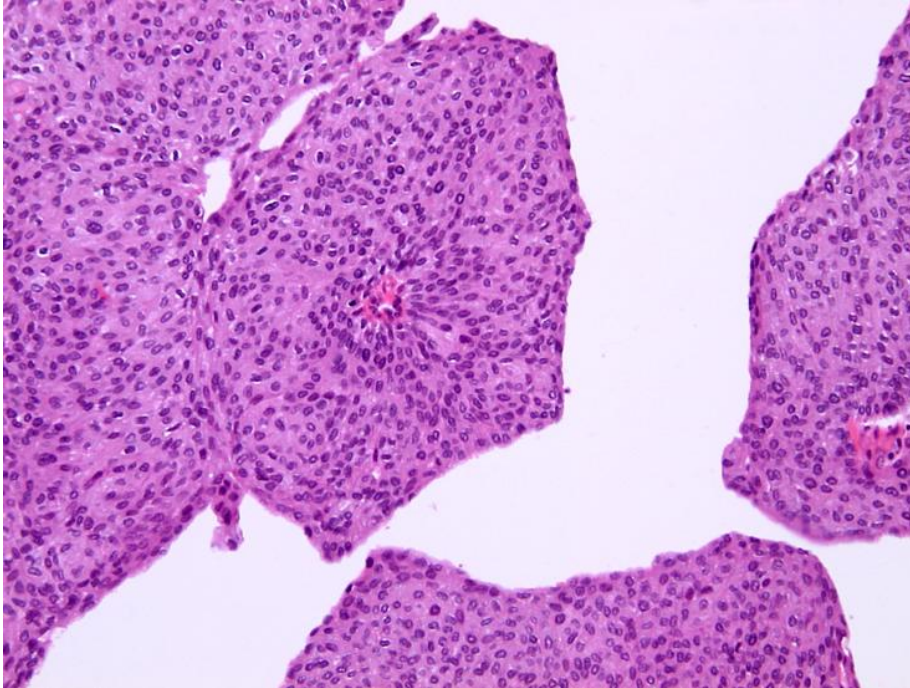
Příloha . 19: Porovnání výsledků mikroskopického vyšetření (barvení hematoxylinem-eosinem), imunohistochemického vyšetření CA IX (IHC) a western blot (WB). (tabulka)

Skupina	Metoda			Počet
	Histologie	IHC	WB	
1	+	+	+	13*
2	+	+	-	4
3	+	-	+	2
4	+	-	-	3
5	+	ND	+	1
Celkem				23

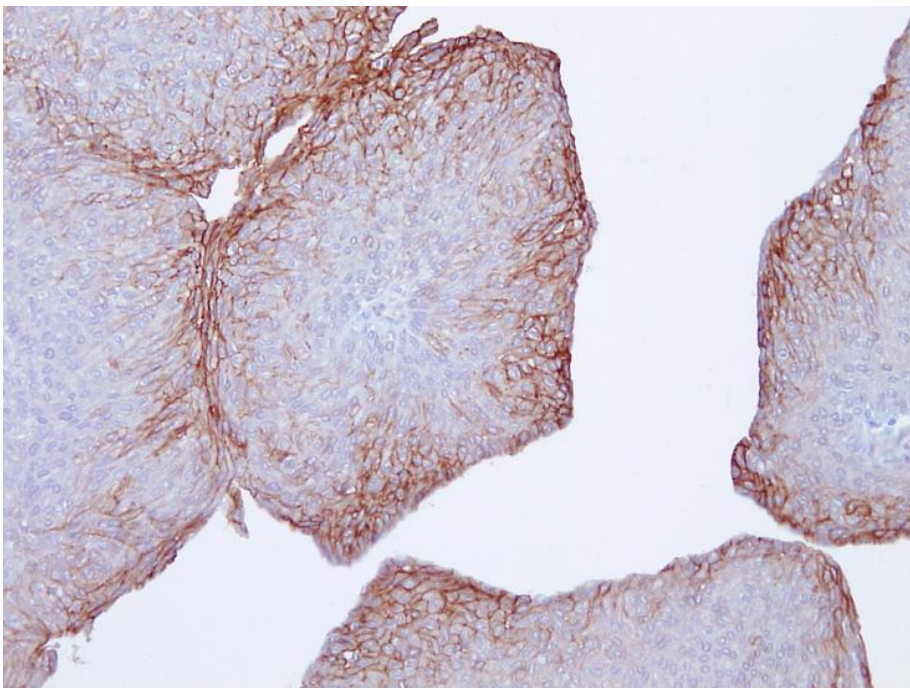
* 12 - TCC a 1 - SCC

ND ó neprovedeno pro malý vzorek

**Příloha . 20: UC močového měchýře, grade 2 (zvětšení 200x), barvení
hematoxylin-eosin. (obrázek)**



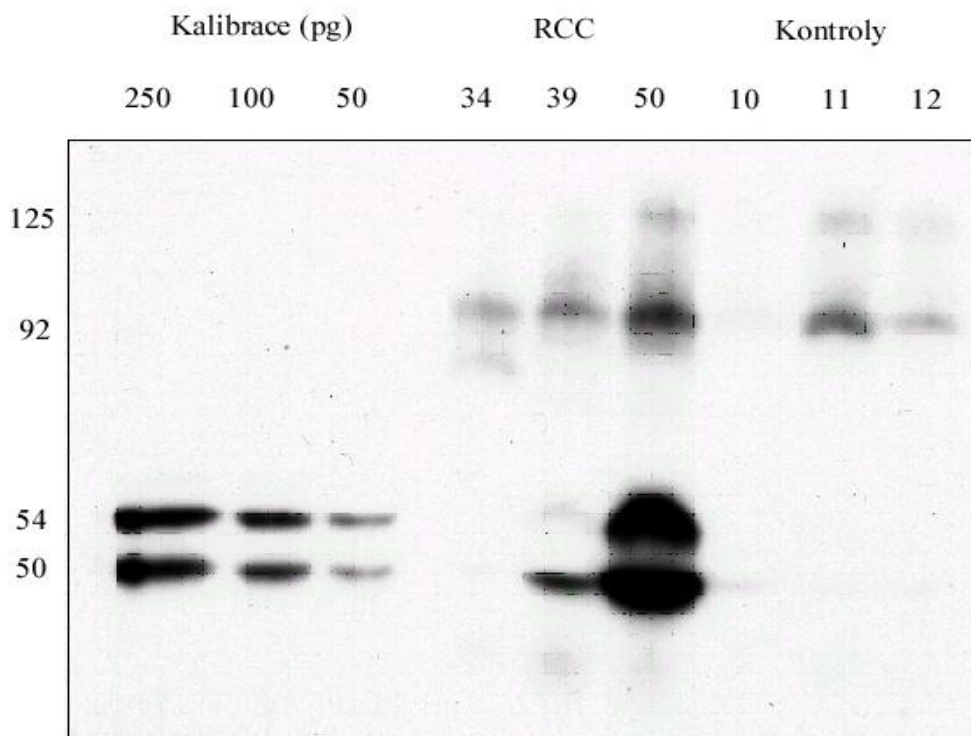
**Příloha . 21: UC močového měchýře, grade 2 (zvětšení 200x), imunohistochemické
barvení na CAIX, barví se hlavně v povrchových částech papilárních nádorových
struktur (skóre 2). (obrázek)**



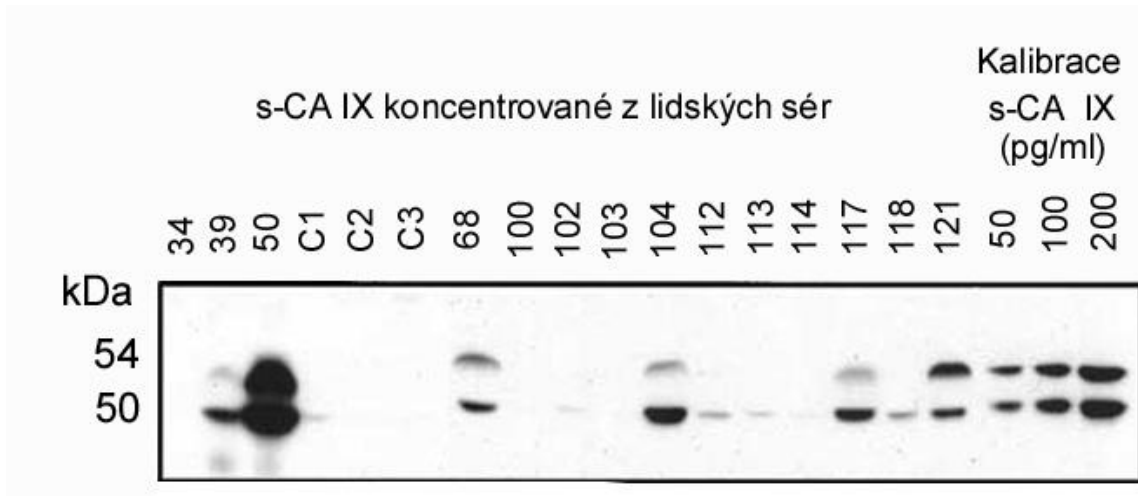
**Příloha . 22: Senzitivita, specificita, PPV a NPV pro s-CA IX v souboru UC.
(tabulka)**

	s-CA IX mo
Senzitivita	69%
Specificita	22%
PPV	69%
NPV	22%

**Příloha . 23: CA IX protein ze séra RCC nemocných a zdravých kontrol (jedna
protilátka). (obrázek)**



Příloha . 24: CA IX protein koncentrovaný ze séra RCC nemocných (dvě různé protilátky). (obrázek)



Vlastní publikace k tématu

1. Závada J, Zavadová Z, Závadová M, Hyršl L, Kawaciuk I: Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Brit J Cancer* 2003;89:1067-1071, . IF 3.894
2. Hyršl L., Kawaciuk I., Závada J., Zavadová Z.: Detection methods of soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in blood serum and in urine of renal cell carcinoma patients. *Eur Urol Suppl* 2004;3: 181, ISSN 1569-9056. IF 1,711
3. Skapa P, Hyršl L, Závada J, Soukup J, Zamecnik J: Carbonic Anhydrase IX Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinomas Negatively Correlates With the Proportion of the Granular Cell Component. *JCO* 2008; 26: 3809-3811, ISSN 0732-183X. IF 17,157
4. Hyršl L, Závada J, Zavadová Z, Kawaciuk I, Veselý S, Skapa P: Soluble form of carbonic anhydrase IX (CAIX) in transitional cell carcinoma of urinary tract. *Neoplasma*, 2009; 56: 298-302, ISSN 0028-2685. IF 1,179
5. Hyršl L, Závada J, Zavadová Z, Kawaciuk I, Veselý S, Skapa P: Karboanhydráza IX (CA IX) a její exprese u adenokarcinomu ledviny a uroteliálních nádorů močového měchýře. *Eur Urol* 2011;15;:85-92, ISSN 1211-8729. IF 0