

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



**Hladina autoprotilátek proti pro-kathepsinu D  
v různých souborech pacientů**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Hradec Králové a Praha 2007

PROKOPOVÁ VERONIKA

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem vědeckým pracovníkům, se kterými jsem měla možnost během vypracování své diplomové práce spolupracovat. Zvláště bych ráda vyjádřila své poděkování mým školitelům Doc. Ing. Martinu Fuskovi, CSc. a RNDr. Jarmile Zídkové, CSc. Ústavu biochemie a mikrobiologie na VŠCHT v Praze, a Ing. Drahomíře Springer ÚKBLD VFN v Praze za poskytnutí vzorků a dlouhodobou pomoc a velmi cenné rady v oblasti nádorových markerů. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Lidmile Fuskové a Doc. PharmDr. Miloši Macháčkovi, Csc. za odbornou pomoc při statistickém vyhodnocení výsledků a v neposlední řadě Prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc. mému vedoucímu diplomové práce.

## POUŽITÉ ZKRATKY

AFP	alfa-1-fetoprotein
ANOVA	analysis of variance
AP	aktivační peptid
AMK	aminokyselina
BSA	bovine serum albumin
CD	kathepsin D
CEA	karcinoembryonální antigen
ER	endoplazmatickém retikulum
EIA	enzymoimunoanalýza
FITC	fluoresceinisothiokyanát
hCG	lidský choriový gonadotropin
IEMA	imunoenzymometrická analýza
IGF-II	Insulin-Like Growth Factor II
IL	interleukin
IRMA	imunoradiometrická analýza
M6P	mannosa-6-fosfát
M6Pr	receptor pro mannosu-6-fosfát
MAP	multiple antigenic peptide
MCA	antigen mucinózních karcinomů
MHC	major histocompatibility complex
MKN	Mezinárodní klasifikace nemocí
NM	nádorový marker
NSE	neuron-specifická enoláza
PBS	phosphate buffer saline
pCD	prokathepsin D
PSA	prostatický specifický antigen
RIA	radioimunoanalýza
RNA	ribonukleová kyselina
SCCA	antigen buněk dlaždicovitého epitelu
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
TPA	tkáňový polypeptidový antigen
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZN	zhoubný nádor

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>7</b>
2.1	Kathepsin D.....	7
2.1.1	Kathepsin D.....	7
2.2	Struktura, aktivace a specifita prokathepsinu D.....	8
2.2.1	Struktura kathepsinu D.....	8
2.2.2	Aktivace a specifita prokathepsinu D.....	9
2.2.3	Mechanismus enzymatické aktivity kathepsinu D .....	10
2.2.4	Intracelulární transport prokathepsinu D.....	11
2.2.4.1	Transport pCD závislý na přítomnosti receptoru pro mannosu-6-fosfát.....	11
2.2.4.2	Transport pCD nezávislý na přítomnosti receptoru pro mannosu-6-fosfát ..	13
2.3	Fyziologická funkce kathepsinu D.....	14
2.4	Úloha kathepsinu D v onkogenezi .....	16
2.4.1	Zapojení kathepsinu D v nádorovém procesu .....	16
2.4.1.1	Úloha estrogenů při expresi a sekreci pCD v nádorových buňkách .....	16
2.4.1.2	Mechanismus mitogenní funkce prokathepsinu D u nádorových onemocnění .....	17
2.4.1.2.1	Proteolytická aktivita.....	18
2.4.1.2.2	Přítomnost sacharidových složek .....	19
2.4.1.2.3	Úloha aktivačního peptidu v mitogenní funkci pCD .....	20
2.5	Metody používané pro stanovení pro- a kathepsinu D.....	22
2.5.1.1	Prognostická hodnota .....	23
2.5.1.2	Metody používané pro stanovení pCD/CD .....	24
2.5.1.2.1	Imunoradiometrické metody (IRMA) .....	24
2.5.1.2.2	Imunohistochemické stanovení pCD/CD.....	25
2.5.1.2.3	Western imunoblotting.....	26
2.5.1.2.4	Afinitní chromatografie.....	26
2.5.1.2.5	Imunoenzymometrická analýza pro stanovení pCD .....	27
2.5.1.2.6	Stanovení CD pomocí ELISA metody .....	27
2.5.1.3	Stanovení autoprotilátek proti pCD a CD .....	28
2.5.1.3.1	Mechanismus vzniku autoprotilátek proti pCD .....	28
2.5.1.3.2	Metody používané pro stanovení autoprotilátek pro pCD .....	29
2.6	Nádorové markery .....	29
2.6.1	Definice nádorového markeru .....	29
2.6.2	Vlastnosti ideálního nádorového markeru.....	30
2.6.3	Klinické využití nádorových markerů.....	31
2.6.4	Rozdělení nádorových markerů.....	34
2.6.5	Charakteristika vybraných nádorových markerů .....	35
2.6.5.1	Humorální nádorové markery .....	35
2.6.5.1.1	Onkoplastantární antigeny .....	35
2.6.5.1.2	Onkofetální antigeny .....	35
2.6.5.1.3	Komplexní glykokonjugáty (glykoproteiny či glykolipidy definované hybridní technikou) .....	36

<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	40
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	41
4.1	Materiál a metodika .....	41
4.1.1	Materiál .....	41
4.1.1.1	Vzorky pacientů .....	41
4.1.1.2	Přístroje .....	41
4.1.1.3	Nástroje .....	42
4.1.1.4	Chemikálie .....	42
4.1.1.5	Mikrotitrační destičky .....	42
4.1.1.6	Sekundární protilátka .....	42
4.1.1.7	Antigen aktivačního peptidu lidského prokathepsinu D .....	43
4.1.2	Příprava roztoků .....	44
4.1.3	Laboratorní postup .....	45
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	47
5.1	Optimalizace metody .....	47
5.1.1	Koncentrace antigenu .....	47
5.1.2	Koncentrace primární protilátky (ředění séra) .....	48
5.1.3	Koncentrace sekundární protilátky .....	48
5.1.4	Druh a koncentrace saturačního činidla .....	49
5.1.5	Délka inkubací, substrátové reakce a promývání .....	50
5.1.6	Teplota a třepání během inkubace .....	51
5.1.7	Vliv skladování sér na hladinu autoprotilátek proti pCD .....	52
5.2	Opakovatelnost a reprodukovatelnost metody .....	52
5.2.1	Opakovatelnost metody .....	53
5.2.1.1	Reprodukovatelnost metody .....	54
5.3	Statistické zpracování získaných dat .....	55
5.3.1	Stanovení autoprotilátek proti aktivačnímu peptidu prokathepsinu D u zdravých pacientů (kontrolní skupina) .....	56
5.3.2	Stanovení autoprotilátek proti prokathepsinu D u dětí .....	58
5.3.3	Stanovení autoprotilátek proti prokathepsinu D u pacientů s neonkologickým onemocněním .....	61
5.3.4	Stanovení autoprotilátek proti prokathepsinu D u pacientů s onkologickým onemocněním .....	66
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	71
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	74
<b>8</b>	<b>LITERATURA</b> .....	75

# 1 ÚVOD

Kathepsin D (E.C. 3.4.23.5.) je lysozomální aspartátová peptidasa syntetizovaná ve všech savčích buňkách. Základní vlastností aspartátových peptidas je schopnost katalyzovat hydrolytické štěpení peptidické vazby v peptidech nebo proteinech.

Důležitým rysem aspartátových peptidas jsou strukturální změny, ke kterým dochází při přeměně nově vytvořeného proteinu na zymogen a následně na aktivní enzym. V případě kathepsinu D nejdříve vzniká prokathepsin D, ze kterého je odštěpena N-vedoucí sekvence a vzniká tak prokathepsin D (zymogen). Při přeměně prokathepsinu D na aktivní kathepsin D dochází k odštěpení aktivačního peptidu o molekulové hmotnosti 4kDa. Aktivní kathepsin D je dále přeměněn na dvouřetězcovou formu zralého kathepsinu D.

Hlavní fyziologická funkce kathepsinu D vyplývá z jeho proteolytické aktivity. V lidském organismu má však i speciální funkce. Podílí se na neovaskularizaci endoteliálních progenitorových buněk, prezentaci antigenů, podporuje růst buněk, udržuje homeostázu ve tkáních. Mimo lysozomální kompartment způsobuje degradaci extracelulárního matrix a podílí se na programované smrti buněk.

V průběhu dlouholetého výzkumu bylo zjištěno, že kathepsin D je v nádorových buňkách prsu a v jiných nádorových buňkách exprimován a sekretován mnohonásobně více než v normálních buňkách. Exprese kathepsinu D je stimulována estrogény nebo progesteronem. Prokathepsin D je v ER<sup>+</sup> buněčných liniích sekretován pouze po stimulaci estrogény, zatímco u ER<sup>-</sup> buněčných linií dochází k pravidelné sekreci. Předpokládalo se, že pCD slouží jako růstový faktor nádorových buněk, proto se další výzkum zaměřil na zjištění mechanismu mitogenní aktivity pCD na nádorové buňky. Důležitou roli v mitogenní aktivitě pCD hraje aktivační peptid, který je odštěpen při strukturálních změnách v průběhu přeměny pCD na aktivní CD.

U pacientů s nádorovým onemocněním často dochází k tvorbě protinádorové imunitní odpovědi (buněčné a humorální) proti nádorovým antigenům. Imunoglobuliny proti nádorovým antigenům a cirkulující antigeny jsou uvolňovány dříve než dojde k rozvoji patrného nádoru nebo před klinickou manifestací remise onemocnění. Stanovení těchto protilátek a analyzování rozpoznávaných antigenů může být využito jako diagnostických či prognostických markerů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kathepsin D

#### 2.1.1 Kathepsin D

Kathepsin D (CD, E.C. 3.4.23.5) je lysozomální aspartátová peptidasa syntetizovaná ve všech savčích buňkách. Jako kathepsiny byly poprvé označeny R. Willstätterem a E. Bamannem kyselými peptidasy, které byly nalezeny ve vodných extraktech různých tkání zvířat. Cílem výzkumu bylo zjistit a pochopit fyziologické funkce kathepsinů. V roce 1941 se objevila první studie o peptidasové aktivitě, díky níž se ukázalo, že proteolytický systém doposud známý jako kathepsin, je tvořen nejméně třemi typy kathepsinů získaných z extraktů hovězí slezin. Na základě jejich specifity k různým syntetickým substrátům jim byla přiřazena jména kathepsin A, B, C, E. V roce 1959 byl objeven další kathepsin označen jako kathepsin D, protože hydrolyticky neštěpil typické substráty pro kathepsin A, B a C. Nově objevený kathepsin D se nelišil pouze ve specifitě k syntetickým substrátům, ale také v mechanismu působení. Působením specifických inhibitorů cysteinových, serinových peptidas a metalopeptidas (jodacetamid, diisopropylfluorofosfát, EDTA) na aktivitu kathepsinu D, bylo zjištěno, že jeho aktivita není těmito inhibitory ovlivněna a díky tomu bylo prokázáno, že kathepsin D je aspartátová peptidasa.

Dnes za kathepsiny považujeme intracelulární enzymy, které rozkládají bílkoviny v prostředí o nízkém pH (optimální pH ~ 3,5-5). Kathepsiny jsou z velké části umístěny v lysozomálních frakcích, čímž se liší od jiných peptidas v buňce (např. trypsin, chymotrypsin). Podle mechanismu účinku patří většina kathepsinů mezi cysteinové (thiolové) peptidas. Kathepsin D je však zástupcem aspartátových peptidas.

V lidském genomu je gen pro prokathepsin D (proenzym kathepsinu D, pCD) lokalizován na patnáctém lokusu 11p chromosomu, obsahuje devět exonů a velikost jeho primárního transkriptu je 2,2 kb. Transkripce genu je iniciována z několika míst, které zahrnují počátek pro vznik transkriptu regulovaného estrogeny [1].

## 2.2 Struktura, aktivace a specifita prokathepsinu D

### 2.2.1 Struktura kathepsinu D

Kathepsin D je řazen do rodiny aspartátových peptidas A1. Tato rodina zahrnuje endopeptidasy vyskytující se v lidském organismu. Většina endopeptidas je aktivní v prostředí s kyselým pH (např. pepsin A, kathepsin D), ale patří sem i výjimky, které jsou aktivní v prostředí s neutrálním pH (např. renin) [2].

Základní vlastností aspartátových peptidas je schopnost katalyzovat hydrolytické štěpení peptidické vazby v peptidech nebo proteinech. Do rodiny lidských aspartátových peptidas řadíme vedle kathepsinu D dále pepsin A, gastrin, renin a kathepsin E. Důvody zařazení kathepsinu D právě do této rodiny jsou společný katalytický mechanismus, optimální nízké pH pro jejich katalytickou funkci a velká podobnost primární a sekundární struktury s ostatními aspartátovými peptidasami. Pepsin A a gastrin jsou součástí žaludeční šťávy. Pepsin je klíčovým enzymem trávicího systému a má širokou specifitu pro štěpení proteinů z potravy v kyselém prostředí dutiny ústní. Renin, nacházející se v ledvinách a v krvi, má oproti pepsinu velmi omezenou specifitu a optimální podmínky při vyšším pH, katalyzuje hydrolýzu angiotenzinogenu a proto se podílí na kontrole krevního tlaku [3].

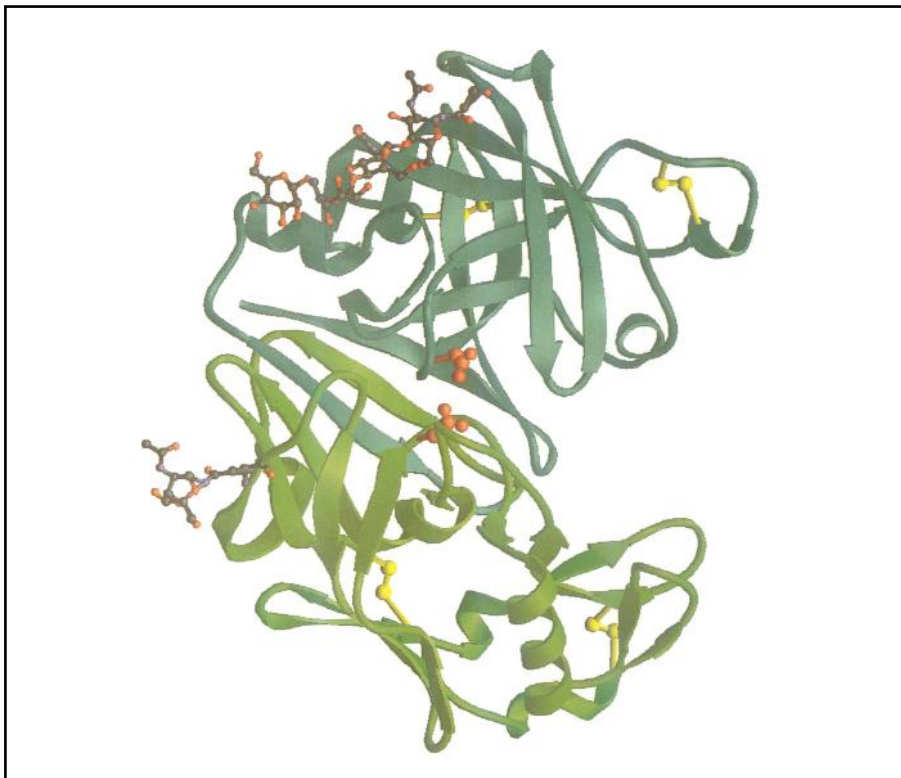
Aspartátové peptidasy se vyznačují značnou mezidruhovou homologií, ale také homologií mezi jednotlivými typy (podobnost pepsinu a kathepsinu D). Ve většině popsáných případů je primární struktura složena ze tří segmentů. První je aktivační peptid dlouhý zhruba 40 AMK, potom následuje N-koncová doména, která obsahuje první vysoce konzervativní strukturu v okolí aktivního aspartátu. N-koncová doména končí zhruba okolo pozice 90 a začíná C-koncová doména. Ta obsahuje druhý aktivní aspartát. Celkem obsahují aspartátové peptidasy ve formě zymogenu přibližně 400 aminokyselin [2].

Primární struktura jednotlivých členů rodiny aspartátových peptidas vykazuje výraznou podobnost, např. v aktivním místě kolem aspartátových zbytků se nachází triáda aminokyselin Asp-Thr-Gly. Velmi podobné, ale ne identické, jsou také sekvence aktivačních peptidů. Kolem triády aspartátů se nachází dlouhý vysoce konzervativní úsek. Polohy cysteinových zbytků, tyrosinu v poloze 75 a jeho okolí jsou také neměnné. Tyrosin 75 je lokalizován v takzvané „flap“ oblasti, která je flexibilní a částečně kryje aktivní místo. U aspartátových peptidas je nápadná vnitřní sekvenční podobnost. Tato vnitřní symetrie je patrná na úrovni primární, sekundární a terciární struktury.



Většina sekundární struktury je tvořena převážně  $\beta$  – konformacemi, které jsou mezi sebou propojené krátkými úseky  $\alpha$  – helixu a spojovacími řetězci.

Terciární struktura je popsána pro většinu aspartátových peptidas. Pro aspartátové peptidasy je typické umístění tří disulfidických můstků na velmi konzervativních místech. Kathepsin D má navíc jeden disulfidický můstek, který se nachází mezi 27 a 96 cysteinovým zbytkem. Tyto peptidasy tvoří dvoulaločnatou strukturu a oba laloky jsou strukturálně podobné, což svědčí o společném předchůdci [3].



**Obr. 1. Struktura kathepsinu D.**

V horní části se nachází N-terminální doména (zelenomodrá barva) a pod ní je C-terminální doména (zelená barva). Uprostřed molekuly kathepsinu D leží aktivní místo s aspartátovými zbytky (červená barva) a dále jsou zde patrné disulfidické vazby (žlutá barva). Na levé straně jsou zobrazeny uhlovodíkové zbytky.

### 2.2.2 Aktivace a specifita prokathepsinu D

Důležitým rysem aspartátových peptidas jsou strukturální změny, ke kterým dochází při přeměně nově vytvořeného proteinu na zymogen a následně na aktivní enzym [3].

Prvním krokem syntézy lidského kathepsinu D je vytvoření pre-pro-enzymu nazývaného jako preprokathepsin D, jehož primární struktura je tvořena ze 412

aminokyselinových zbytků. Preprokathepsin D myši obsahuje 410 aminokyselinových zbytků, u krysa je to 407 a u kuřat se jedná o 398 aminokyselinových zbytků.

Tento prekurzor vždy obsahuje N-vedoucí sekvenci, která u lidí obsahuje 20 aminokyselinových zbytků a je odštěpena během translokace přes membránu hrubého endoplazmatického retikula. Vzniká tak inaktivní prokathepsin D (zymogen).

Před vznikem plně aktivního enzymu dochází při posttranslační modifikaci k odštěpení tzv. pro-sekvence označované jako propeptid nebo aktivační peptid (AP) a vzniká aktivní kathepsin D. Molekulová hmotnost aktivačního peptidu je 4 kDa, což odpovídá 44 aminokyselinovým zbytkům.

Z CD je dále odštěpen malý peptid o 7 AMK mezi polohami 98 a 105 a vzniklý N-koncový lehký řetězec (15 kDa) a C-koncový řetězec (30 kDa) jsou poté spojeny nekovalentními interakcemi a tvoří tak dvouřetězcovou formu CD (zralý CD). Většina lidského a prasečího CD existuje výhradně ve dvouřetězcové formě, zatímco výskyt CD skotu je téměř rovnoměrně rozdělen mezi jedno- a dvouřetězcové formy. Myši a krysy CD existuje prakticky pouze v jednořetězcové formě [1].

Jak vyplývá z podobnosti aminokyselinové sekvence prokathepsinu D a pepsinogenu, prokathepsin D může podléhat autokatalytickému štěpení za vzniku aktivního kathepsinu D (CD) o molekulové hmotnosti 48 kDa [1]. Při detailním studiu dozrávání CD bylo zjištěno, že v průběhu autoaktivace se tvoří tzv. pseudo-kathepsin D, který ještě obsahuje C-terminální část aktivačního peptidu připojenou na zralý enzym. Úplné aktivace CD může být dosaženo jen za přítomnosti dalších lysozomálních peptidas [3].

### **2.2.3 Mechanismus enzymatické aktivity kathepsinu D**

Mechanismus enzymatické aktivity CD je umožněn existencí dvou aspartátových zbytků, které se nachází v těsné blízkosti na dně aktivního místa. Aktivní místo CD má tvar hluboké a relativně dlouhé štěrbině stejně jako u ostatních aspartátových peptidas a je podobné aktivnímu místu pepsinu [1]. Pro enzymatické působení aspartátových peptidas je důležitý stupeň protonizace těchto aspartátových zbytků, ke které dochází v oblasti s kyselým pH. Aktivní místo může vytvářet nekovalentní interakce s až 9 aminokyselin dlouhým substrátem nebo inhibitorem. Substrátem jsou fragmenty peptidových nebo proteinových struktur.[2]

Působením nekovalentních interakcí dochází jednak ke stabilizaci substrátu v aktivním místě, ale také ke změně konformace, která vede ke snížení aktivační energie samotné

hydrolýzy peptidové vazby. Dva aspartátové zbytky pak oslabí peptidickou vazbu a umožní její hydrolýzu molekulou vody [2].

Aktivační peptid je ve struktuře pCD umístěn tak, že vyplňuje aktivní místo. Mezi funkce aktivačního peptidu patří účast na sbalování enzymů po syntéze, udržování struktury, inhibice enzymatické aktivity. Ze strukturálního hlediska je zásadní přítomnost několika lysinových zbytků, které směřují svými postranními řetězci dovnitř aktivního místa a vytvářejí pevnou iontovou vazbu s aktivními aspartáty. Aktivační peptid tak brání přístupu substrátu do aktivního místa, ale zároveň má další funkci. Stabilizuje terciární strukturu zymogenu (pCD) v bazickém pH. Jakmile dojde ke snížení pH, hydrofobní skupiny na povrchu aktivačního peptidu jsou nahrazeny bazickými nabitými skupinami a dojde k tomu, že celý AP se rozvine a zpřístupní se tak k hydrolýze buď intra- nebo intermolekulárním mechanismem [4].

Štěpením B řetězce inzulinu jako substrátu bylo potvrzeno, že také specifita CD je pepsinu podobná a při štěpení jsou preferovány peptidové vazby za hydrofóbními aminokyselinami[2]. Specifita CD je kromě pepsinu A podobná také reninu. Pepsin A má širokou specifitu, zatímco specifita reninu je striktně omezena [3].

Proteolytickou aktivitu lze podobně jako u některých aspartátových peptidas inhibovat pepstatinem [1]. Pepstatin A je nekovalentní, pevně se vázající kompetitivní inhibitor izolovaný z různých kultur *Streptomyces*. Jedná se o hexapeptid s neobvyklou strukturou ve středu molekuly, který obsahuje dva zbytky neproteinogenní aminokyseliny statinu. Pepstatin A se mnohonásobně nekovalentně váže na oba aspartáty v aktivním místě enzymu [3].

## **2.2.4 Intracelulární transport prokathepsinu D**

Výskyt kathepsinu D je úzce spojen s kyselým prostředím lysozomů, prelysozomálních a endosomálních váček. Existují nejméně dva způsoby, kterými se pCD dostává do cílových kompartmentů [3].

### **2.2.4.1 Transport pCD závislý na přítomnosti receptoru pro mannosu-6-fosfát**

První způsob transportu pCD je závislý na přítomnosti mannosu-6-fosfátu. Při posttranslační modifikaci CD dochází k N-glykosylaci nejčastěji dvěma oligosacharidovými řetězci (Asn 70 a Asn 199) obsahujícími mannosu[5]. Za fyziologických podmínek je pCD shromažďován v lysozomech a nedochází k sekreci pCD ani CD[6].

Mannosové zbytky cukerných řetězců jsou nejprve modifikovány enzymem N-acetylglukosamin-fosfotransferasou a potom je vázaný N-acetylglukosamin odstraněn N-acetylglukosamin-1-fosfodiester- $\alpha$ -N-acetylglukosaminidasou. Výsledkem této přeměny je vznik mannosu-6-fosfátu (M6P) na cukerných řetězcích. Glykosylace doprovázená fosforylací je rozhodující pro normální intracelulární transport pCD. Připojením M6P značky se oddělí vzniklý protein od sekrečních cest, protože sekreční proteiny nepodléhají této modifikaci [2]. Při experimentálních pokusech bylo zjištěno, že pokud dojde k odstranění obou glykosylačních míst, je nově vytvořený pozměněný pCD stabilní, ale nedochází k sekreci a cílený transport do lysozomů probíhá obtížně [5].

Jedna molekula pCD tedy nese dva signály pro vazbu receptorů mannosu-6-fosfátu (M6Pr). Interakce s těmito receptory analogicky jako u ostatních lysozomálních enzymů zajišťuje transport pCD do lysozomů. Většina M6Pr je primárně lokalizovaná v *trans*-Golgiho retikulu, kde také dochází k jejich interakci s lysozomálními enzymy nesoucími M6P značku.

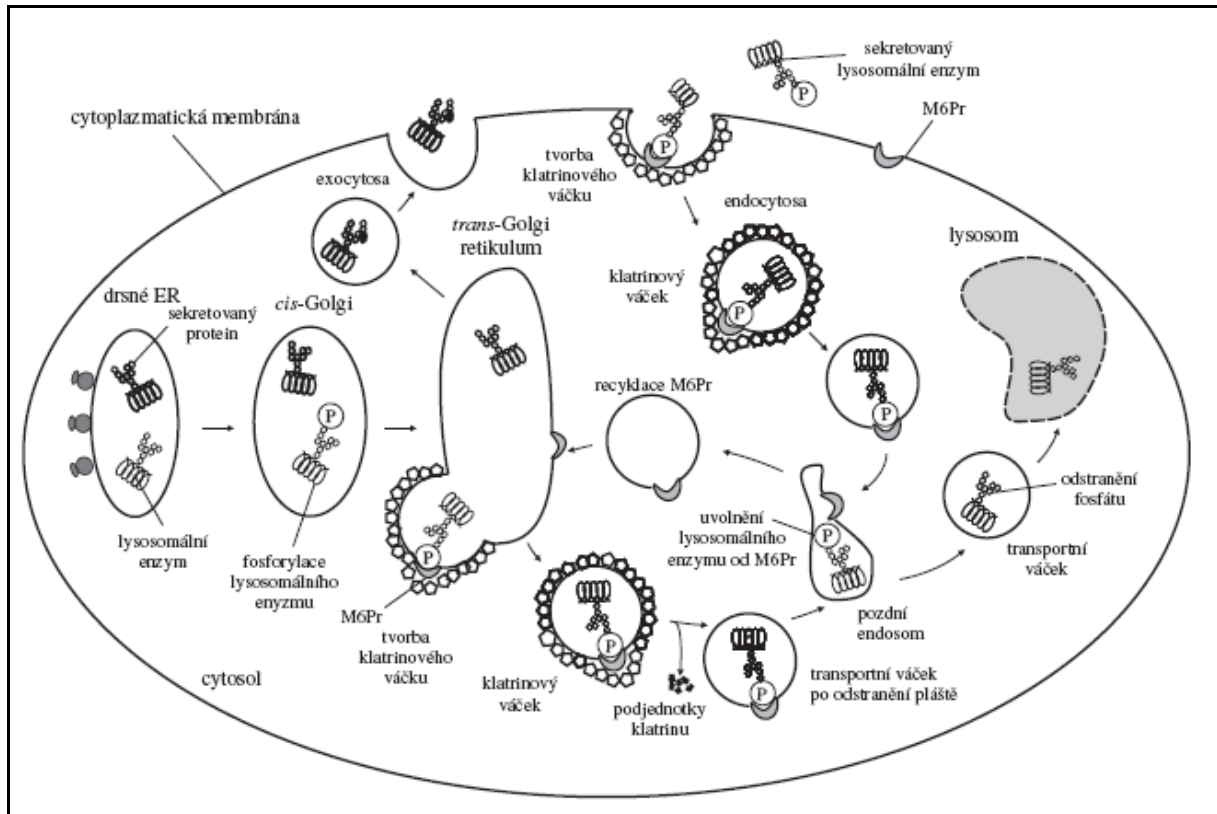
Komplex těchto M6Pr s připojenými lysozomálními enzymy je soustředěn na malém úseku membrány *trans*-Golgiho retikula, která je na straně cytosolu pokryta strukturální bílkovinou klatrinem. Působením klatrinu je tento úsek membrány oddělen a vytvoří se speciální transportní váčky, z nichž je klatrin postupně odbouráván. Tyto holé transportní váčky fúzí s třídícími váčky a tvoří tak organelu zvanou pozdní endosom, uvnitř které je pH okolo 5,5. Snížení pH způsobí uvolnění M6Pr z lysozomálních enzymů, protože vazba M6Pr s M6P je stabilní při pH 6,5-7. Z pozdních endosomů vznikají dva typy váček. Jeden typ váček obsahuje lysozomální enzymy (ve formě fosforylovaných glykoproteinů). V těchto váčkách, které fúzí s lysozomy, je od C6 mannosy fosfatasou odštěpen fosfát, což zabraňuje zpětnému navázání transportovaných proteinů na M6Pr. Druhý typ váček obsahuje M6Pr, který se navrácí zpět do *trans*-Golgiho retikula [1].

Jak bylo zmíněno výše, slouží interakce proteinů s M6Pr k transportu hydrolas z *trans*-Golgiho retikula do lysozomů. Dosud jsou známy pouze dva druhy M6P receptorů interagujících s pCD.

První z nich, M6P/IGF-II receptor, je transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti blízké se k 300 kDa, který specificky váže také IGF-II (Insulin-like Growth Factor II) a zprostředkovává endocytózu sekretovaných lysozomálních enzymů a IGF-II. Tento M6P receptor je nezávislý na přítomnosti kationtů.

Druhý typ receptorů o molekulové hmotnosti 46 kDa se neúčastní endocytózy, je závislý na přítomnosti kationtů. Oba tyto M6P receptory se nachází na povrchu plazmatické

membrány, přičemž kationt-nezávislý M6P brání úniku CD nebo pCD z buněčného prostředí a je také schopen vázat extracelulární pCD a zajistit jeho skladování. Experimenty s buňkami postrádajícími jeden či druhý typ receptorů ukázaly, že pCD je přednostně sekretován fibroblasty, kterým chybí M6P/IGF-II receptor [7].



**Obr. 2. Transport prokathesinu D v nenádorových buňkách.**

#### **2.2.4.2 Transport pCD nezávislý na přítomnosti receptoru pro manosa-6-fosfát**

Druhý způsob cíleného transportu pCD do lysozomů je nezávislý na přítomnosti manosa-6-fosfátu a navzdory rozsáhlému výzkumu není dosud zcela znám. Bylo zjištěno, že u nádorových buněčných linií prsu a ovarií je pCD těsně vázán v komplexu s 68 kDa proteinem, který byl za použití specifických protilátek identifikován jako prosaposin [8].

Saposiny A, B, C a D jsou malé termostabilní glykoproteiny, vznikající ze společného prekursoru prosaposinu v lysozomech. Tyto proteiny aktivují různé lysozomální hydrolasy, které se účastní metabolismu sfingolipidů. Kromě své lysozomální funkce je prosaposin také přítomen jako integrální membránový protein a jako neštěpený hraje různé role v tělních tekutinách, např. v seminální plazmě, lidském mléce a cerebrospinálním moku. Bylo navrženo, že právě tato molekula prosaposinu by mohla být zodpovědná za tento alternativní

transport pCD. Komplex pCD s prosaposinem se vytváří ihned po syntéze pCD na endoplazmatickém retikulu [4]. Vzniklý komplex umožňuje transport pCD, který se takto dostává do kyselých kompartmentů nezávisle na přítomnosti M6P receptorů. Předpokládá se, že C-terminální konec pseudo-kathepsinu D, může být zapojen do interakce mezi pCD a prosaponiny [3].

Některé studie naznačují, že existuje alternativní cesta pro transport pCD do lysozomů. Tato alternativní cesta se zdá být více důležitá u nádorových buněk než u normálních buněk. Alternativní transport pCD se projevuje nízkou akumulací zralého enzymu v lysozomech a zvýšenou sekrecí proenzymu. Kultivací buněk v přítomnosti  $\text{NH}_4\text{Cl}$  můžeme zabránit transportu pCD pomocí M6Pr.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  je slabá báze zvyšující pH v tzv. třídících endosomech, která může zabránit disociaci komplexu pCD-M6Pr/IGF II a následné recyklaci M6Pr zpět do Golgiho aparátu. Při kultivaci fibroblastů a zdravých buněk prsní žlázy s  $\text{NH}_4\text{Cl}$  je nově syntetizovaný pCD sekretován z buněk, přičemž nedochází k jeho akumulaci v lysozomech. Tato rezistence vůči  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se zdá být specifická pro pCD, zatímco u stejných buněčných linií ostatní enzymy jako  $\beta$ -hexosaminidasa,  $\alpha$ -glukosidasa a arylsulfatasa reagují na přítomnost  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [9].

## 2.3 Fyziologická funkce kathepsinu D

CD je přítomen v lysozomech všech savčích buněk, kde přispívá hlavním podílem k degradaci proteinů ve spolupráci s ostatními peptidasami. Jeho zastoupení se liší u různých tkání a je rovněž přítomen v endosomech určitých typů buněk jako např. makrofágů a hepatocytů. Většina kathepsinu D se nachází v rozpustné formě ve většině lidských buněk, zatímco 20 % je zřejmě vázáno na membrány [1].

Kathepsin D má vedle hlavní proteolytické funkce v lysozomech i jiné speciální funkce. Podílí se na neovaskularizaci endoteliálních progenitorových buněk, prezentaci antigenů, podporuje růst buněk, udržuje homeostázu ve tkáních. CD má také rozhodující funkci i mimo lysozomy. V případě, že je CD uvolněn do extracelulárního prostředí, působí degradaci extracelulární matrix a v případě fibroblastů stimuluje jejich invazivní růst. CD uvolněný do cytosolu vyvolává programovanou smrt buněk. V prelysozomálních kompartmentech aktivuje prekurzory biologicky aktivních proteinů [10].

CD hraje důležitou roli také při proteolytické úpravě prekurzor hormonů, neuropeptidů nebo antigenů pro jejich prezentaci. Glykoproteiny II. třídy MHC jsou za fyziologických

podmínek přítomny jen na buňkách prezentujících antigen. V endoplazmatickém retikulu je vazebné místo pro MHC II blokováno krátkým peptidem (tzv. invariantním řetězcem), takže se do něj mohou navázat peptidové fragmenty vzniklé štěpením vlastních bílkovin. Komplex glykoproteinů MHC II s invariantním řetězcem je z ER transportován přes Golgiho retikulum do sekrečních váčků, které po oddělení od Golgiho retikula fúzí s endosomy. Po fúzi endosomu se sekrečním váčkem degradují kathepsiny v endosomech invariantní řetězce a do uvolněného vazebného místa glykoproteinů MHC II se pak mohou navázat peptidové fragmenty endocytovaných proteinů. Degradace pohlcených cizorodých proteinů v endosomech patří mezi další funkce kathepsinů [1].

Při pokusech, kdy došlo k záměrnému vyřazení genu pro CD, bylo zjištěno, že homozygotní myši embrya se vyvíjela normálně. Během prenatálního vývoje CD-deficientních myši mohl být CD nahrazen jinou peptidasou nebo byl získán nejdříve z plazmy a později z mateřského mléka matky [11]. Pokud mláďata přestala být kojena, začala ztrácet na váze a 26 dní po narození došlo k náhlému úmrtí. Hlavní změny byly pozorovány ve střevě (nekróza, silné krvácení) a v thymu (nekróza). Toto zjištění vedlo k myšlence, že některé epitelální buňky vyžadují CD poskytující nezbytné růstové faktory pro remodelaci a obnovu tkání [10].

Zajímavé je, že v mateřském mléce nacházíme relativně vysokou koncentraci prokathesinu D, ale doposud neznáme jeho funkci [1].

Předpokládá se, že pCD se účastní programované buněčné smrti – apoptózy. Úloha kathepsinu D v procesu apoptózy není ještě zcela známa a je třeba další zkoumání. CD je schopen buď inhibovat nebo podporovat apoptózu prostřednictvím různých mechanismů, které závisí na podmínkách prostředí (fyziologické nebo patologické). Dále bylo zjištěno, že CD je klíčovým mediátorem apoptózy indukované mnoha apoptickými látkami (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , oxidativní stres, adriamycin, etoposid, cisplatina a 5-fluorouracil) [10].

Zdá se, že tkáňově specifickou funkcí CD, je účast při syntéze prolaktinu. Krysí prsní žlázy používají CD pro tvorbu biologicky aktivního fragmentu prolaktinu [6].

## **2.4 Úloha kathepsinu D v onkogenezi**

### **2.4.1 Zapojení kathepsinu D v nádorovém procesu**

Na počátku 80. let skupina H. Rocheforta zkoumala vliv estrogenů na nádorové buňky prsu (MCF7). Jejich snahou bylo izolovat proteiny, jejichž exprese je stimulována estrogeny. Zjistili, že v největším množství je sekretován protein o molekulové hmotnosti 52 kDa. Zásadním krokem pro identifikaci 52 kDa proteinu bylo izolovat specifické monoklonální protilátky, purifikace tohoto proteinu a studium jeho kotranslačních a posttranslačních modifikací. Purifikovaný protein byl identifikován jako prokathepsin D [12].

#### **2.4.1.1 Úloha estrogenů při expresi a sekreci pCD v nádorových buňkách**

Po 25. letech výzkumu je velmi dobře zdokumentováno, že pCD je exprimován a sekretován mnoha rakovinovými buněčnými liniemi a přidání estrogenů nebo progesteronu zvyšuje expresi i sekreci pCD. pCD je v ER<sup>+</sup> buněčných liniích (obsahují estrogenový receptor) sekretován pouze po stimulaci estrogeny, zatímco u ER<sup>-</sup> buněčných liniích dochází k pravidelné sekreci. U ER<sup>+</sup> buněčných linií estrogeny ovlivňují a regulují tvorbu pCD na úrovni promotoru [3].

Steroidní receptory zvyšují rychlost iniciace transkripce specifických genů interakcí s transkripčním aparátem na úrovni promotoru. Gen pro kathepsin D je kontrolován smíšeným promotorem, který má rysy regulačních i provozních genů. Promotor regulačních (fakultativních) genů obsahuje TATA box, který váže transkripční faktor IID a určuje iniciační místo transkripce. Provozní geny, na rozdíl od regulačních genů, postrádají rozpoznatelný TATA box, ale obsahují mnohonásobně více GC boxů, které se chovají jako vazebné místo pro transkripční faktor Sp1. Přítomnost TATA boxů v promotoru genu pro CD je nezbytná pro iniciaci transkripce. Estrogeny stimulují transkripci genů pro CD prostřednictvím estrogen-responzivní sekvence, která se nachází v proximální oblasti promotoru. Estrogeny stimulují pouze TATA-dependentní transkripci v nádorových buňkách prsu [13].

Ve zdravé savčí buňce, například v lidském fibroblastu, je většina syntetizovaného pCD cílena do lyzozomů, kde rychle probíhá štěpení na aktivní formu kathepsinu, a jen malé množství pCD je akumulováno v jiných částech buňky nebo sekretováno [14]. V několika



liniích hormonálně závislých (MCF7) a nezávislých (MDA-MB-231,BT20) nádorových buňkách prsu byla zjištěna značně zvýšená sekrece pCD (nad 50 %) a akumulace 52 kDa a 48 kDa forem v buňkách. Změna transportu a sekrečního mechanismu pCD je pravděpodobně způsobena nadprodukcí pCD, který vysytí vazebná místa M6P receptorů. Nadprodukce pCD a dalších lysozomálních peptidas je v hormonálně závislých nádorových buňkách prsu indukována estrogény. Estrogény v těchto buňkách navíc snižují expresi M6Pr. Bylo prokázáno, že snížení exprese může být regulováno na úrovni transkripce i translace [6]. Sekreci lysozomálních enzymů z nádorových buněk prsu tedy usnadňují estrogény dvěma způsoby, neboť velké množství exprimovaného pCD má k dispozici snížený počet M6Pr. Princip indukce exprese pCD v hormonálně nezávislých nádorových buňkách prsu nebyl dosud pozorován. Sekreci pCD nádorovými buňkami, která byla vyvolána estrogény, je možno inhibovat specifickým estrogenovým inhibitorem, kterým je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin [11].

#### **2.4.1.2 Mechanismus mitogenní funkce prokathepsinu D u nádorových onemocnění**

Mechanismy působení pCD na proliferaci nádorových buněk jsou intenzivně zkoumány. Z dosažených výsledků vyplývá, že pCD může při stimulaci růstu nádorových buněk uplatňovat dva na sobě nezávislé způsoby. pCD může na nádorové buňky působit přímo, to znamená, že uplatňuje nějaký vlastní strukturní motiv a interaguje například jako růstový faktor s povrchovým receptorem buňky nebo působí jako inhibitor kontrolních mechanismů při dělení buňky.

Při nepřímém mitogenním působení může CD uplatnit svoji proteolytickou aktivitu. Z extracelulárního matrix může například uvolňovat molekuly, které mohou podporovat růst nádorových buněk. Struktura extracelulárního matrix je tímto způsobem narušena, čímž je usnadněna invaze nádorových buněk. Aktivní CD může napomáhat také degradaci bazální membrány, což je jeden z kroků vedoucí k metastáze nádorových buněk [1].

Zvýšená hladina a regulace exprese pCD v mnoha typech nádorových onemocnění vedla k směřování výzkumu k objasnění možného mitogenního a proliferačního mechanismu pCD a funkce podporující nádorového bujení. Bylo zjištěno, že pCD podporuje růst okolních nádorových buněk.

Byl proveden experiment, kdy koncentrace pCD tvořeného nádorovými buňkami byla snížena po použití ribozymů. Při porovnání proliferační aktivity těchto pozměněných buněk

s nezměněnými buňkami byla zjištěna silná korelace mezi hladinou vytvořeného pCD a proliferačním potenciálem [6]. pCD se účastní metastatického potenciálu nádorových buněk, což bylo podpořeno výsledky hodnotící invazi přes membránu Matrigelu. Bylo dokázáno, že invazivnost těsně koresponduje s množstvím sekretovaného pCD u modelů nádorů prsu a plic [15],[16].

V zásadě je možné předpokládat, že následující strukturální nebo funkční rysy pCD mohou být spojeny s mitogenní funkcí nebo funkcí spojenou s rozvojem nádorového bujení:

- proteolytická aktivita v kyselém prostředí
- přítomnost sacharidových složek (fosforylovaných)
- přítomnost primární struktury reagující s ostatními rozpustnými nebo nerozpustnými (membránově vázanými) molekulami
- jiný neznámý mechanismus

Tyto rysy mohou obecně interagovat v extracelulárním i intracelulárním prostředí.

#### **2.4.1.2.1 Proteolytická aktivita**

Proteolytická aktivita CD se uplatňuje při degradaci extracelulárního matrix a bazální membrány obklopující primární nádor. Nádorové buňky si v organismu často vytváří mikroprostředí o nižším pH, než je pH fyziologické. Nádorové buňky mohou snižovat pH extracelulárního prostředí produkcí kyseliny mléčné a pomocí  $H^+$ /ATPasové pumpy, která z vnitřního prostředí buňky transportuje protony přes cytoplazmatickou membránu. pH může být takto sníženo až na hodnotu 5,5, což je dostačující pro aktivaci pCD [17].

Bylo potvrzeno, že pCD může být zodpovědný za degradaci extracelulární matrix. Při pokusech, ve kterých se sledovalo působení pCD obsaženého v médiu po kultivaci MCF7 buněk s estrogény, bylo zjištěno, že dochází k degradaci extracelulárního matrix připraveného z hovězích rohokových endoteliálních buněk. Nejvíce docházelo k degradaci při pH v oblasti 4-5 [56].

Proteolytická aktivita byla prvním mechanismem, který byl navržen pro mitogenní funkci a funkci nádorového růstu. Zvýšená exprese CD v nádorových buněčných liniích zvyšuje koncentraci pCD, což nejspíše vede ke zvýšené saturaci M6P receptorů. Je zřejmé, že tyto buňky budou také dodávat více pCD do lysozomů a to povede ke zvýšení proteolytické aktivity lysozomů. Na druhé straně, CD je proteolyticky aktivní při pH nižším než 5,5 a je obtížné najít takto nízké pH extracelulárně v nádorové tkáni [3].

Přesto však několik experimentů podporuje hypotézu, že proteolytická aktivita není v tomto případě nejvýznamnějším důvodem zvýšené proliferace buněk inkubovaných s pCD. Ve studii zabývající se mechanismem mitogenní aktivity pCD bylo zjištěno, že mitogenní aktivita *in vitro* je spojena pouze s přítomností pCD, nikoli však s CD, u kterého tato aktivita nebyla prokázána. Po přidání pepstatinu A nedošlo k inhibici mitogenní aktivity pCD [15].

Proti zapojení proteolytické aktivity do mitogenní funkce prokathepsinu D hovoří studie, zabývající se pokusem, při kterém byla provedena mutace v aktivním místě pCD. Cíleně došlo k substituci aspartátu 231 za asparagin a takto pozměněný pCD byl použit pro mitogenní pokus *in vitro* a *in vivo*. Mutace provedená na pozici 231 v aktivním místě tohoto enzymu, vedla ke ztrátě proteolytické aktivity, zatímco stabilita, tvorba a uvolňování pCD nebylo ovlivněno [56]. S ohledem na řadu dalších studií se dá usuzovat, že proteolytická aktivita s velkou pravděpodobností není zapojena do mitogenní aktivity pCD a také se neúčastní růstu nádorů [3].

#### **2.4.1.2.2 Přítomnost sacharidových složek**

Velká pozornost je věnována úloze sacharidových jednotek obzvláště jejich možné interakci s M6P receptorem. Vysoká koncentrace M6P inhibuje interakci pCD a M6Pr na buněčném povrchu a blokuje tak vstup pCD do buněk. V případě, že by mitogenní aktivita pCD byla vyvolána prostřednictvím M6P reziduí, nadbytek M6P by ji mohl inhibovat.

V již zmíněné studii zabývající se mechanismem mitogenní aktivity pCD bylo sledován vliv nadbytku M6P na mitogenní aktivitu pCD, který byl v tomto případě negativní. Předpokladem byla kompetice M6P a pCD o vazbu na M6Pr. Odstranění sacharidových jednotek ze struktury pCD vedlo k nepatrnému snížení mitogenní aktivity v případě proliferativních a aktivačních pokusů. Vysvětlení je takové, že deglykosylace enzymu je často doprovázena určitým stupněm porušení původní struktury proteinu. Sacharidové jednotky nejsou proto rozhodující pro mitogenní aktivitu pCD [15].

Ve studii skupiny H. Rocheforta, která byla zaměřena na interakci pCD s M6P receptorem ve snaze vysvětlit uvolňování a transport pCD, bylo zjištěno, že pCD *in vitro* reaguje normálně s M6P/IGF II receptorem nádorových buněk a může být tímto receptorem endocytován. Nicméně v několika *in vivo* pokusech s nádorovými buněčnými liniemi prsu a ovarií bylo zjištěno, že tento receptor je částečně nebo zcela nefunkční k transportu pCD do lysozomů, intracelulárnímu transportu a následně k jeho sekreci [17]. Předpokladem je, že vyšší koncentrace pCD vysytí kation-dependentní M6P receptory, což vede ke snížení počtu

vazebných míst pro proteiny s M6P značkou i pro IGF II. Následkem toho je nedostatečná funkce MGP receptorů, která může napomáhat karcinogenezi.

U pCD nebyl pozorován žádný vliv M6P značky a sacharidových jednotek podporující nádorový růst [3].

#### **2.4.1.2.3 Úloha aktivačního peptidu v mitogenní funkci pCD**

Nádorovými buňkami je uvolňován pouze enzymaticky inaktivní pCD s intaktním aktivačním peptidem. Předpokládá se, že tento aktivační peptid je pravděpodobně zodpovědný za mitogenní aktivitu pCD [15]. U plně aktivovaného CD nebyla prokázána mitogenní aktivita [3].

pCD na nádorové buňky působí jako autokrinní růstový faktor. Proto byl proveden pokus zaměřený na porovnání účinku pCD a IGF II. IGF II je známý mitogen pro většinu lidských buněčných linií. Z výsledků bylo patrné, že účinek IGF II umocňující růst nádorových buněk prsu je identický účinku pCD, ale IGF II ovlivňoval proliferaci všech typů testovaných nádorových buněk oproti pCD[6]. Kromě autokrinního působení pCD se předpokládají i určité parakrinní účinky této molekuly, které se zdají být klíčové při komunikaci nádorových buněk s okolními stromálními buňkami. Molekula pCD iniciuje v nádorových buňkách sekreci cytokinů. Cytokiny zajišťují intercelulární přenos informací. Cytokiny inhibují i podporují růst nádorových buněk. Mezi sekretovanými cytokiny byl prokázán: interleukin 4 (IL-4), IL-8, IL-10, IL-13 a makrofágový zánětlivý protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), které mohou působit jako parakrinní i autokrinní mitogeny v nádorovém procesu [19].

Použití syntetického peptidu, který představoval část AP a monoklonálních protilátek rozpoznávající epitop uvnitř aktivačního peptidu, umožnilo otestování jeho vlastností při *in vivo* a *in vitro* pokusech. Poté byly použity monoklonální protilátky vytvořené proti syntetickým aktivačním peptidům nebo proti jeho určité části a byla zkoumána jejich schopnost zabránit vazbě pCD k buňkám, inhibovat mitogenní aktivitu pCD a inhibovat růst experimentálních nádorových buněk *in vivo*. Protilátky, které rozpoznávají epitop uvnitř aktivačního peptidu pCD, silně inhibovaly mitogenní funkci pCD, zatímco protilátky proti CD, které neinteragují se samotným AP, neměly na růst buněk žádný vliv [12].

Na základě poznatků 3D struktury molekuly pCD byly vytvořeny syntetické aktivační peptidy, které představovaly celou sekvenci a nebo různé fragmenty této molekuly. Následně se sledovala mitogenní aktivita těchto peptidů, resp. jejich fragmentů. Při kultivaci různých typů buněk s takto připraveným AP byly naměřeny podobné proliferační aktivity jako

v případě pCD. Buněčné linie odvozené od nádorových buněk odpovídaly na přítomnost AP v mediu jen o málo intenzivněji než na přídavek pCD a naopak u linií, které na pCD nereagovaly, nebyla naměřena žádná odpověď ani pro AP. Nepatrné snížení mitogenní aktivity AP oproti pCD lze vysvětlit konformační flexibilitou volného AP. AP jako součást molekuly mění hůře konformaci, která je vhodná pro mitogenní receptor. Pro srovnání byly měřeny také interakce s pepsinogenem. Zralý pepsin má s CD podobnou prostorovou strukturu, avšak primární struktury aktivačních peptidů se liší [3].

Pro potvrzení hypotézy, že na povrchu nádorových buněk existuje receptor, který je schopen vázat AP, byl připraven konjugát pCD-FITC. Po interakci konjugátu pCD-FITC s buněčným povrchem nádorových buněk prsu byla průtokovou cytometrií měřena intenzita fluorescence jednotlivých buněk. Preinkubace nádorových buněk prsu s aktivačním peptidem vedla ke snížení intenzity fluorescence, což poukazuje na to, že na povrchu buněk se nachází receptor společný jak pro aktivační peptid, tak pro pCD. Paralelně bylo blokování povrchových receptorů pozorováno u buněk, které byly preinkubovány s neoznačeným pCD. Dodatečně byla provedena inkubace buněk s konjugátem FITC-pCD a pCD protilátkami a zde nedošlo k navázání konjugátu na povrch buněk [15].

Po zjištění, že na povrchu nádorových buněk se nachází doposud neznámý receptor, který umožňuje vazbu AP pCD, bylo dalším cílem určit, která část AP je zodpovědná za interakci s tímto receptorem. Na základě znalostí 3D struktury zralého CD a modelové struktury pCD byly připraveny dva syntetické peptidy, které představovaly prvních 26 (1-26) a druhých 18 (27-44) AMK aktivačního peptidu. Použitím stejného experimentálního postupu byla sledována jejich mitogenní aktivita. Výsledkem bylo zjištění, že vazebné místo AP je lokalizováno někde mezi AMK na pozicích 27-44. Účinnost množství tohoto peptidu odpovídala účinku vyvolaného stejným množstvím celého aktivačního peptidu nebo pCD [20].

Význam aktivačního peptidu v karcinogenezi a jeho metastatický potenciál byl podpořen *in vivo* experimenty. Mitogenní aktivita pCD byla sledována při *in vivo* pokusech na zvířecím modelu. Athymickým myším byla injikována buněčná linie odvozená od nádorových buněk prsu (MDA-MB-231) přímo do tukových polštářů prsní žlázy. Po dvou týdnech se zkontrolovalo, zda došlo k vývoji nádoru [20]. Myším s patrným nádorem prsu byly poté intravenózně injikovány biodegradační želatinové mikrokuličky obsahující 100 µg buď pCD, IgG protilátky proti pCD, protilátky proti fragmentu 1-27 AP, protilátky proti fragmentu 36-44 AP nebo bezvýznamné lidské IgG protilátky proti faktoru I (kontrolní protilátky). V různých časových intervalech došlo k usmrcení těchto myší a velikost nádoru byla hodnocena dle jeho váhy. U myší léčených protilátkami buď proti pCD nebo

protilátkami proti fragmentu 36-44 AP došlo k výraznému zvratu v růstu nádoru. Samotný pCD způsobil pouze mírné zvýšení růstu nádoru oproti kontrolní skupině, nepochybně díky krátké životnosti pCD *in vivo*[6].

Předpokládá se, že interakce aktivačního peptidu pCD s dosud neznámým receptorem na povrchu nádorových buněk je zprostředkována sekvencí 36-44 AP [12]. Úloha tohoto receptoru spočívá nejen v cíleném transportu pCD ale také v možném zprostředkování mitogenní aktivity pCD. Po zjištění, že interakce pCD s tímto receptorem může být signálem pro spuštění mitogenní aktivity, se dá předpokládat dvojí funkce pCD. pCD se po aktivaci chová jako peptidasa nebo jako ligand membránových receptorů před vlastní aktivací [17]. Zablokování interakce AP pCD specifickými protilátkami nebo obdobně působícími antagonisty by mohlo být cenným nástrojem inhibující nádorová onemocnění prsu [12].

## 2.5 Metody používané pro stanovení pro- a kathepsinu D

V současné době existuje mnoho přístupů pro stanovení koncentrace pCD nebo CD a u pacientů s nádorovým onemocněním.

Pomocí metod imunohistochemie, *in situ* hybridizace, cytosolické imunoanalýzy a Northern a Western blottingu, bylo zjištěno, že koncentrace CD je u nádorových buněk prsu 2-50krát vyšší v porovnání s ostatními buňkami, jako jsou fibroblasty a normální buňky prsu [11].

Několik klinických studií ukázalo, že hladina CD v primárních nádorech prsu je nezávislým prognostickým parametrem, který koreluje s incidencí klinických metastáz a s kratší dobou přežití těchto pacientů. Dále bylo zjištěno, že vysoká koncentrace CD je markerem pro agresivnost nádorů. Mezi hlavní buňky produkující CD patří nádorové buňky a tkáňová makrofázi, kteří se nachází v okolí nádorové tkáně.

Studie zabývající se stanovením pCD zjistily jeho zvýšenou koncentraci v plazmě u pacientů s metastatickým nádorem prsu. Zdá se, že část sekretovaného pCD nádorovými buňkami je uvolňována do cirkulace [10].

Pomocí imunohistochemických metod, *in situ* hybridizace, cytosolické imunoanalýzy a Northern a Western imunoblottingu bylo zjištěno, že v nádorových buňkách dochází ke zvýšení mRNA a hladiny CD.

Pomocí imunohistochemické analýzy a RNA in situ hybridizace bylo zjištěno, že místa se zvýšenou tvorbou CD jsou lokalizována v nádorové tkáni prsu nikoli v nádorových fibroblastech. Zdá se, že mechanismus zvýšené tvorby CD v nádorových buňkách nezahrnuje amplifikaci genů ani nedochází k chromozomálnímu přeskupení [11].

Kvantifikace proteolytické aktivity CD v cytosolu po aktivaci v kyselém prostředí poskytuje stejné výsledky [21].

Studie prováděné nestandardizovanými in situ imunohistochemickými metodami a metodami Western blottingu jsou často v rozporu. Tyto nesrovnalosti mohou být způsobeny použitím různých fixačních metod a protilátek, nedostatečnou kvantifikací a ztrátou sekretované formy CD během fixace. Imunohistochemickou analýzu CD komplikuje fakt, že poměrné přispění infiltrujících makrofágů a nádorových buněk není srovnatelné. Bylo zjištěno, že koncentrace CD v cytosolu více koreluje s obarvením nádorových buněk než s počtem makrofágů, ale ostatní skupiny používající jiné protilátky poukazují na význam produkce CD stromálními buňkami [11].

### **2.5.1.1 Prognostická hodnota**

Bylo zjištěno, že CD může sloužit jako prognostický faktor u mnoha druhů nádorů. Silná prediktivní hodnota koncentrace CD byla nalezena u nádorového onemocnění prsu a také u jiných druhů nádorů. Použitím specifické monoklonální protilátky proti pCD se zjistilo, že koncentrace pCD je zvýšena u pacientů s rakovinou prsu s metastatickým šířením[11],[14],[17]. Studie věnované prognostické hodnotě pCD ukázaly, že u pacientů s nádorovým onemocněním prsu bez zasažení uzlin, kde dochází k sekreci CD, se zvyšuje riziko návratu nemoci a je zde také vyšší riziko úmrtí. Tato data nebyla potvrzena u nádorového onemocnění prsu u mužů. Prognostická hodnota u jiných gynekologických malignit je nejistá, ale je zde silný vztah mezi hodnotami pCD a stupněm agresivity a chemorezistence ovariálních a endometriálních nádorových onemocnění [17].

Přítomnost a funkce pCD byla studována nejen u rakoviny prsu, ale také u jiných typů nádorových onemocnění jako jsou: nádory vaječníků a dělohy, kolorekta a tlustého střeva, nádory ORL oblasti, nádory štítné žlázy, prostaty, žaludku, melanom a nádory centrálního nervového systému [22].

Problémy určování prognostické hodnoty pCD mohou být částečně způsobeny nedostatkem standardních metod pro určování koncentrace pCD. Je důležité, zda se stanovuje koncentrace aktivovaného CD, koncentrace pCD nebo suma koncentrací obou forem a jestli

měříme koncentraci extracelulární nebo intracelulární. Mnoho studií nerozlišuje mezi pCD a CD a to je pravděpodobně příčinou odlišnosti výsledků získaných v různých laboratořích[3]. Je důležité si uvědomit, že pCD je protein, který má odlišné vlastnosti, chování molekuly a ve většině případů i odlišné funkce než zralá forma CD. Proto by každé výsledky měly být doplněny o přesně definované podmínky a použité techniky při stanovení. Právě z těchto důvodů zůstává prognostická hodnota pCD stále kontroverzní [23].

### **2.5.1.2 Metody používané pro stanovení pCD/CD**

Studie zabývající se stanovením cytosolické koncentrace pCD nebo CD využívají imunoanalytické metody (IRMA, RIA, EIA, ELISA), Western blotting, Northern blotting, in situ hybridizace a pro stanovení CD ve tkáni jsou využívány imunohistochemické metody.

#### **2.5.1.2.1 Imunoradiometrické metody (IRMA)**

Většina studií zabývajících se stanovením koncentrace pCD a CD v cytosolu nádorových buněk je prováděna pomocí imunoradiometrické analýzy (IRMA). IRMA je založena na použití dvou monoklonálních protilátek (D7E3 a M1G8), s jejichž pomocí můžeme stanovit celkové množství CD (formy 52 kDa, 48 kDa a 34 kDa).

Pevná fáze je potažena první protilátkou (D7E3), která váže stanovovaný antigen, zatímco druhá protilátka (M1G8) radioaktivně značená  $^{125}\text{I}$  slouží jako indikátor určující, zda došlo k navázání antigenu [28]. Pomocí použitých protilátek jsou rozpoznány stericky vzdálené epitopy, které jsou společné pro všechny tři formy CD [24],[25].

Souprava na stanovení celkové koncentrace CD je komerčně dodávaná (ELSA-cath D-kit; CIS Biointernational, Gif-sur-Yvette, France). Tato souprava byla validována Evropskou organizací pro výzkum a léčbu rakoviny (EORTC). Podle výrobce je návratnost celkové koncentrace CD 98-111% a detekční limit je mezi 20 až 4000 pmol/l v extraktu [26].

Použitím imunoradiometrické metody bylo možné zjistit specifitu protilátek proti pCD, které byly poprvé vytvořeny skupinou H. Rocheforta. pCD byl získán z média MCF7 buněk a byl injikován vybraným Biozziho myším. Lymfocyty ze sleziny jedné z těchto myší byly spojeny s myším myelomem. Vyprodukované monoklonální protilátky byly purifikovány a naklonovány pro další použití. Jednalo se o imunoglobuliny G1 izotypu. Získané protilátky specificky rozpoznávaly sekretovaný pCD, což bylo patrné z výsledku



dvojité imunoprecipitace a imunoblottingu po jejich elektroforetické separaci a transferu. Identifikace, charakterizace a aplikace těchto monoklonálních protilátek vedla k dalšímu studiu vlastností pCD [27].

Studie používající ke stanovení CD imunoradiometrické metody se shodují v některých předpokladech. Při sledování závislosti koncentrace CD na různých prognostických nebo prediktivních faktorech (věk, vliv menopauzy, velikost nádoru, metastázy do lymfatických uzlin) bylo zjištěno, že koncentrace CD nezávisí na věku, i když v některých studiích byla zjištěna statisticky výraznější frekvence výskytu CD u pacientů ve středním a vyšším věku, než u mladších pacientů. Vliv menopauzy a korelace s velikostí nádoru nebyla prokázána. Výrazně vyšší frekvence výskytu CD byla prokázána u pacientů s nádorem prsu s metastatickým zasažením lymfatických uzlin, než u pacientů bez metastáz [28],[26],[29].

#### **2.5.1.2.2 Imunohistochemické stanovení pCD/CD**

Imunohistochemické metody se využívají zejména ke zjišťování přítomnosti CD a poukazují na specifickou lokalizaci CD v nádorové tkáni, což dovoluje hodnotit různorodost mezi jednotlivými typy nádorů [29].

Stanovení CD se provádí v parafinových histologických řezech získaných z různých druhů nádorových tkání a byla také provedena studie, která se zabývala stanovením CD v oční tkáni. Výsledkem bylo zjištění, že CD se nachází ve většině buněk oční tkáně [30]. Fixace se provádí nejčastěji formalínem, který umožňuje lepší morfologické hodnocení oproti např. acetonu [31].

Tyto histologické řezy jsou inkubovány s protilátkou (např. myší, králičí) vytvořenou proti epitopům v molekule CD, která rozpozná tři formy – prokathepsin, aktivní a zralý CD. Reakce je následně vizualizovaná avidin-biotin peroxidasovou metodou s použitím diaminobenzidinu tetrachloridu [32].

Díky dostupnosti monoklonálních či polyklonálních protilátek je možné detekovat expresi CD v histologických řezech a současně je možné stanovit ostatní biologicky proměnné faktory (např. koncentrace estrogenových a progesteronových receptorů) v tomtéž nebo podobném histologickém řezu, což umožňuje sledovat interakce mezi různými markery na buněčné úrovni a přispívá k pochopení biologie nádorového onemocnění [30].

### 2.5.1.2.3 Western imunoblotting

Pomocí metody Western imunoblottingu můžeme analyzovat produkci a sekreci CD v nádorových buňkách využívající monoklonální protilátku proti CD k rozlišení pro- a zralé formy CD. Proteiny jsou nejdříve separovány pomocí SDS-PAGE a následně dochází k jejich transferu na nitrocelulóзовou membránu, k níž se přidají monoklonální protilátky proti CD[33]. Vizualizace proběhlé reakce se provádí různými způsoby v závislosti na použité metodice[33],[34],[35].

Ve většině publikovaných studií na stanovení CD v nádorových buňkách je koncentrace CD vyjadřována jako celkové množství antigenu přítomného v testovaných vzorcích, které tedy zahrnuje inaktivní pCD, aktivovaný a zralý CD. Pro získání přesnějších dat je důležité měřit koncentraci pCD a CD [33].

Metodou Western blottingu za použití dvou odlišných polyklonálních protilátek byla prokázána přítomnost pCD v mateřském mléce krysy. Bylo zjištěno, že obě protilátky rozpoznávají krysí pCD. Současně bylo provedeno stanovení proteolytické aktivity CD použitím fluorogenního substrátu specifického pro CD. Proteolytická aktivita v pufrech se zvyšující se aciditou rostla v závislosti na objemu přidaného mléka při pH 3. Zjistit, zda pozorované změny intenzity fluorescence v závislosti na čase jsou způsobeny přítomností jiných složek než molekulou CD v mléce, vedlo k pokusu s pepstatinem A. Pepstatin A zcela inhiboval proteolytickou aktivitu CD [35].

### 2.5.1.2.4 Afinity chromatografie

Afinity chromatografie s pepstatinem se používá k separaci pCD od zralé formy CD. K hodnocení vazby pCD na pepstatin byly připraveny extrakty z buněčných kultur, které se smísily s pepstatinyl-agarózou při pH 3,5 a 5,3. Následně byla provedena imunoprecipitace s protilátkami proti těžkým řetězcům CD, dále byla provedena gelová elektroforéza a fluorografie. Preinkubace extraktů s rozpustným pepstatinem zamezila navázání všech forem CD při pH 3,5. To vedlo ke zjištění, že pCD může být odlišen od ostatních forem CD na základě pH-dependentní pepstatinové inhibice [36].

Díky pepstatinové afinity chromatografie můžeme získat velmi čisté vzorky pCD izolované od ostatních forem CD. Studie využívající metodu afinity chromatografie se snažily vyřešit otázku autokatalytické aktivace pCD. Zda pCD je schopen sám sebe aktivovat

na pseudo-kathepsin dosud neznámým molekulárním mechanismem nebo zda k jeho aktivaci dochází v přítomnosti aktivní formy CD je dosud nejasné[37].

#### **2.5.1.2.5 Imunoenzymometrická analýza pro stanovení pCD**

Imunoenzymometrická analýza (IEMA) byla vytvořena pro stanovení prokathepsinu D. Tato metoda kombinuje použití dvou monoklonálních protilátek, z nichž primární je přímo proti pCD a je vázána na mikrotitrační destičku, zatímco sekundární protilátka spojená s alkalickou fosfataseou je schopna vázat zralou formu CD.

Tato metoda je použitelná pro stanovení pCD nejen v plazmě nebo v mediu buněčné kultury, ale zejména v cytosolu a buněčných extraktech, kde je koncentrace pCD výrazně nižší oproti celkové koncentraci CD.

Pomocí této metody bylo provedeno srovnávací zhodnocení pCD a zralého CD v cytosolu nádorových buněk prsu a u benigních mastopathií. Při stanovení celkového množství CD v cytosolu nebyl mezi těmito dvěma skupinami významný rozdíl. Naopak při stanovení cytosolické koncentrace pCD bylo zjištěno, že mezi vyšetřovanými skupinami byl významný rozdíl a díky tomu je možné rozlišit mezi benigním a maligním nádorovým onemocněním prsu. Zvyšující se poměr pCD k celkovému CD v cytosolu nádorových buněk prsu by mohl být ukazatelem transformace buněk [38].

Na obdobném principu je založena imunoenzymatická metoda pro stanovení CD, při které je možno k detekci reakce použít radioaktivně nebo enzymově značenou protilátku [39],[40],[41].

#### **2.5.1.2.6 Stanovení CD pomocí ELISA metody**

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je další metodou používanou pro stanovení CD v různém biologickém materiálu (př. cytosol, sérum, peritoneální tekutina).

Mikrotitrační destička je potažena protilátkou, která je schopna vázat CD z přidaného séra pacienta. Následně je přidána sekundární protilátka značená nejčastěji peroxidaseou, která se naváže na komplex primární protilátky a CD. K vizualizaci se do reakční směsi přidává chromogenní substrát (př. *o*-fenyldiamin), reakce je zastavena a poté se měří absorbance při různých vlnových délkách v závislosti na použité komerčně dodávané soupravě [42],[43].

### **2.5.1.3 Stanovení autoprotilátek proti pCD a CD**

U pacientů s nádorovým onemocněním často dochází k tvorbě protinádorové imunitní odpovědi jak humorální tak buněčné proti nádorovým antigenům.

Zdá se, že tato imunitní odpověď je vyvolaná antigeny v důsledku chybné exprese genů, onkogenů nebo následkem změn při posttranslačních modifikacích molekuly, zahrnující změny v glykosylaci a fosforylaci. Nejdůležitějšími vlastnostmi nádorových protilátek jsou jejich specifita k běžným aberantním epitopům a načasování jejich objevení.

Imunoglobuliny proti nádorovým antigenům a cirkulující antigeny jsou uvolňovány dříve, než dojde k rozvoji patrného nádoru nebo před klinickou manifestací remise onemocnění. Stanovení těchto protilátek a analýza rozpoznaných antigenů může být využito jako diagnostických či prognostických markerů.

Přítomnost autoprotilátek byla zjištěna u nádorů prsu, hlavy a krku, ovarií a také u melanomů [44].

#### **2.5.1.3.1 Mechanismus vzniku autoprotilátek proti pCD**

Mechanismus imunogenicity pCD sekretovaného nádorovými buňkami je rozmanitý. Jedním z možných mechanismů je bodová mutace, která vede ke změně aminokyselinové sekvence v genu pro CD. U nádorového onemocnění prsu byla sledována bodová mutace, při které dochází k záměně alaninu za valin v oblasti aktivačního peptidu. Tato bodová mutace byla pozorována u 23-30% testovaných nádorových i normálních buněk. Tato změna přispívá ke genetickému polymorfismu a dochází ke zvýšení hydrofobicity a změně v transportu pCD.

Druhým popsaným mechanismem vyvolávající autoimunitní reakci je nadměrná exprese pCD, která je výsledkem amplifikace nebo zvýšené stability proteinu.

Třetím mechanismem vedoucím k rozvoji autoimunitní humorální odpovědi je změna v glykosylaci. V případě, že dojde ke glykosylaci na odlišných místech, vzniká tak jiná molekula proteinu, proti jejíž pozměněné části dochází k tvorbě protilátek. Tato glykosylovaná místa následně podléhají fosforylaci. Pozice fosfátových skupin a struktura oligosacharidů má zásadní roli podmiňující afinitu enzymu k M6P receptorům, proto změna glykosylačních míst, může snížit afinitu pCD a M6P receptorům.

Dalším možným mechanismem vzniku protilátek je nevhodná exprese molekuly CD. K tomu může dojít v případě, že intracelulární protein je exprimován v extracelulárním prostředí, což vede k tvorbě autoprotilátek. pCD a CD jsou za normálních okolností

lokalizovány intracelulárně, proto jejich extracelulární sekrece může vyvolat autoimunitní odpověď [45].

### **2.5.1.3.2 Metody používané pro stanovení autoprotilátek pro pCD**

K ověření, zda autoprotilátky proti pCD jsou výsledkem reakce imunitního systému pacienta, se používají různé metody, z nichž nejčastěji se jedná o ELISA metodu. Pomocí ELISA metody můžeme zjistit přítomnost a koncentraci těchto autoprotilátek. Naměřená koncentrace autoprotilátek u pacientů s nádorovým onemocněním je porovnávána s koncentrací u zdravých pacientů.

Přítomnost imunoglobulinů specificky reagujících s pCD a zralou formou CD získaných od pacientů je poté analyzována pomocí Western immunoblottingu [45].

Pro identifikaci specifických epitopů pCD rozpoznávaných imunitním systémem pacienta se používá peptid-specifická ELISA. pCD je nejdříve vystaven proteolytickému štěpení trypsinem a vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí RP-HPLC. Oddělené fragmenty jsou analyzovány za použití monoklonálních protilátek a sér pacientů. Výsledkem je zjištění nejčastěji rozpoznávaných a zároveň imunogenních fragmentů molekuly pCD [46].

## **2.6 Nádorové markery**

### **2.6.1 Definice nádorového markeru**

Nádorové markery (NM) jsou v současné době středem pozornosti při diagnostice, léčbě a dlouhodobém sledování nemocných s nádorovým onemocněním [47].

Nádorové markery jsou molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje nádorového procesu. Jejich výskyt ve tkáni zhoubného nádoru (celulární nádorové markery) a v tělních tekutinách (humorální, hlavně sérové nádorové markery) souvisí s růstem nádoru v organismu. Nádorové markery jsou produkovány buď samotným nádorem, nebo jinými tkáněmi, jako odpověď na nádorový proces v organismu (indukované nádorové markery). Přítomnost v tělních tekutinách je podmíněna přechodem těchto látek z místa syntézy do cirkulace [48].

Přítomnost této chemické substance v nádoru lze využít k diferenciaci nádoru od normální tkáně při histochemickém vyšetření. Její přítomnost v plazmě nebo v jiných

tělních tekutinách vyšetřovaných osob signalizuje většinou přítomnost nádoru. Koncentrace této látky v plazmě či v tělních tekutinách je v přímé úměrnosti k velikosti nádoru. V případě vyléčení (odstranění nádorové nemoci) látka z krve vymizí [49].

## 2.6.2 Vlastnosti ideálního nádorového markeru

Nádorový marker by měl splňovat několik kritérií, aby byl co nejvíce klinicky využitelný.

Prvním kritériem, které by měl ideální NM splňovat, je vysoká specifita vzhledem k nádorovému onemocnění. Pacienti bez maligního nádoru by měli poskytovat negativní výsledek testu. Tento předpoklad však zdaleka neplatí pro většinu nádorových markerů, protože některá nenádorová onemocnění (např. zánětlivá) poskytují pozitivní výsledek testu.

Druhým kritériem NM je vysoká orgánová specifita. Pozitivní hodnota nádorového markeru by měla cíleně vypovídat o postižení konkrétního orgánu. Ani tento předpoklad však není často splněn.

Třetím kritériem ideálního NM je jeho vysoká citlivost. Jedná se o schopnost laboratorního ukazatele prokázat přítomnost zhoubného nádoru v počátečním stádiu. Množství nádorových markerů nespĺňuje ani tento předpoklad a v dostatečně vysokém procentu jsou pozitivní až u velkých zejména generalizovaných nádorů. Citlivost můžeme zvýšit při kombinaci několika nádorových markerů, avšak obvykle za cenu nižší specifity.

Dalším kritériem je korelace hladiny NM s velikostí nádoru, stádiem onemocnění, prognózou a efektem léčby. Koncentrace nádorového markeru závisí nejen na rozsahu nádoru, ale i na stupni zralosti jeho buněk, dále na schopnosti produkovat příslušný marker a vyplavovat ho do krve [50]. Koncentrace NM se obvykle pohybuje v pásmu nízkých koncentrací, ne v oblasti gramů či molů, jak je tomu u běžných biochemických parametrů, ale v oblasti mikrogramů až nanogramů/litr [49]. Proto je nutné stanovit tzv. diskriminační hodnotu (hladinu cut-off), která vyjadřuje vztah mezi diagnostickou senzitivitou a specifitou. Diskriminační hodnota pro stanovení hladiny NM je definovaná jako hraniční hodnota, pod kterou leží většina hodnot zdravých lidí a pacientů s benigním onemocněním [47].

Vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění neexistuje dosud univerzální nádorový marker, a ani senzitivita při dostatečné specifitě nedosahuje ideálních 100 %. Proto tedy nezvýšená koncentrace NM není ještě důkazem nepřítomnosti maligního onemocnění, a

naopak pozitivní výsledek nemusí nutně znamenat zhoubný nádor. Snahou je nalézt takové NM, které by byly orgánově specifické, detekovatelné v co nejčastějším stadiu maligní transformace, které by korelovaly s růstem nádoru, stádiem, prognózou a odrážely efekt terapie [48].

### **2.6.3 Klinické využití nádorových markerů**

Nádorová onemocnění provázejí lidstvo již od nepaměti. S prodlužováním věku a potlačováním infekčních chorob však jejich zdravotní i sociální závažnost prudce narůstá. V roce 2004 bylo v České republice nahlášeno 68 641 nových případů zhoubných novotvarů a novotvarů in situ, z toho 34 759 u mužů a 33 882 u žen. Nejčastější onkologickou diagnózou je „jiný zhoubný novotvar kůže“ (dg. C44 dle MKN 10), který tvoří přibližně pětinu všech nahlášených případů. Jedná se o nádory s nízkou malignitou a mortalitou a pro svá specifika jsou často z dalších analýz vyřazovány. Přibližně polovinu případů u mužů tvoří zhoubné novotvary plic, kolorekta, prostaty a močového ústrojí. U žen jsou nejčastěji diagnostikovány karcinomy prsu, kolorekta, ZN plic a ZN gynekologického a močového ústrojí.

Nádorové onemocnění může být diagnostikováno v jakémkoli věku, riziko diagnózy však s věkem stoupá. V roce 2004 byl zjištěn nejvyšší počet nádorů u osob mezi 70 a 75 lety. V relativním pohledu je výskyt nejvyšší u nejstarší věkové skupiny – u osob starších 85 let. Přes 80% nově zjištěných případů bylo diagnostikováno u osob starších 50 let. Jen asi desetina případů u žen byla diagnostikována do stáří čtyřiceti let a u mužů mladších 40 let to bylo dokonce jen 4,5% případů. Zhoubné novotvary v dětském věku se stejně jako v minulých letech vyskytovaly výjimečně.

Podle Českého statistického úřadu v roce 2004 v České republice zemřelo na diagnózu zhoubného nádoru 29 168 osob, z toho 16 218 mužů a 12 950 žen. Úmrtnost na zhoubné novotvary se oproti roku 2003 snížila u mužů i žen [51].

Nádorové markery umožňují v současné době nové přístupy v léčbě onkologicky nemocných pacientů. Mohou přispět k rozlišení mezi benigním a maligním nádorem, k určení stádia onemocnění a především jsou vhodné pro včasný záchyt recidivy onemocnění. Proto indikované použití vhodného markeru může rozhodujícím způsobem přispět k výsledku léčby a tím zlepšit dobu přežití nemocného [47].

V současné době se stanovení koncentrací nádorových markerů uplatňuje v několika oblastech terapie nádorových onemocnění. Jedná se o:

- screening maligních nádorů,
- diagnostiku maligních nádorů,
- určení stádia (staging) a prognózy nádorového onemocnění,
- sledování průběhu nádorového onemocnění
- kontrola efektu terapie
- dlouhodobé sledování s cílem včasného záchytu progresu onemocnění a generalizace.

Kritérii pro screening maligních nádorových onemocnění jsou efektivnost včasného záchytu a správnost screeningového testu (především senzitivita a specifická) [47]. Nedostatečná specifická NM pro určité nádorové onemocnění neumožňuje v současné době využít preventivního stanovování nádorových markerů jako nástroje k odhalení přítomnosti nádorového onemocnění [52].

Stanovení nádorových markerů pro primární diagnostiku podobně jako pro screening nebývají NM příliš vhodné z důvodu nízké diagnostické senzitivity, specifické a také z důvodu malé orgánové specifické. Mohou však být nápomocné při hledání primárního nádoru u prokázaných metastáz nebo v diferenciální diagnostice u pacientů se suspektním maligním onemocněním [48].

Při diagnostice maligního onemocnění rozlišujeme markery hlavní, vedlejší a doplňkové (viz. Tabulka 1.). Hlavní marker je markerem první volby s vysokou senzitivitou a specifickou pro daný druh nádoru. Vedlejší marker je markerem druhé volby, který se stanovuje zpravidla paralelně s markerem prvním volby. Má menší senzitivitu a specifickou pro daný nádor, ale v kombinaci s hlavním markerem zvýší záchyt příslušného nádoru. Doplňkový marker má většinou poměrně nízkou senzitivitu a specifickou pro detekci maligního onemocnění, ale bývá specifický pro konkrétní orgán (tedy může mít vysokou orgánovou specifickou). Kromě toho jeho pozitivita bývá signálem generalizace nádoru [47].

Vysoké hodnoty NM mohou upozornit na špatně určené nižší stádium onemocnění [48]. Význam NM pro určení prognózy není exaktně definován tak jako u jiných prognostických faktorů. Prognosticky nepříznivé jsou extrémně vysoké hodnoty NM. Je nutné si však uvědomit, že výška hladiny NM nezávisí jen na velikosti nádoru, ale i na řadě jiných faktorů, které nemají s prognózou nic společného [52].

Sledování průběhu choroby je hlavní doménou indikace k vyšetření NM. Analýza hladin NM v krvi bývá přínosná pro hodnocení remise, resp. podezření na reziduální nádor. Vzestup hladin NM představuje včasné upozornění na relaps choroby. Je vhodné sledovat kinetiku NM a hodnotit výrazné změny ještě v rámci referenčního rozsahu [48]. Existuje i program (např. CRACRES, tj. Cancer Recurrence Analysis, Correlation, Testing and



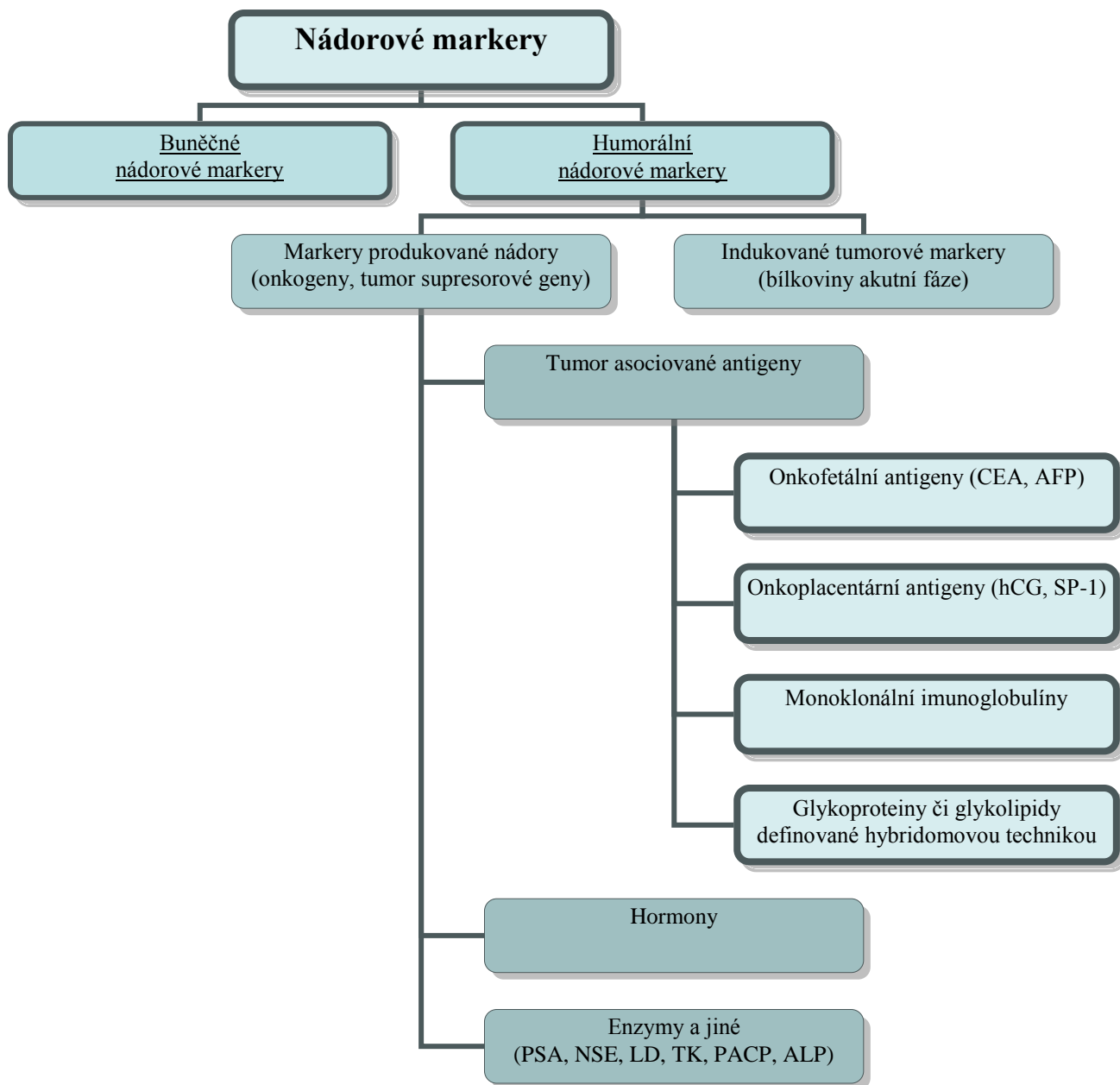
Statistics) umožňující zhodnotit dynamiku NM v několika po sobě následujících měřeních a odhadnout pravděpodobnost relapsu nebo progresu nádorového onemocnění [50].

Pro hodnocení efektu léčby je nutné opakované vyšetření NM a posouzení dynamiky [52]. Vždy je nutné stanovit hladinu nádorového markeru před léčbou (chirurgickou, radio- či chemoterapií). Rychlý pokles NM svědčí pro efektivitu léčby, dosažení normálních respektive negativních hodnot NM může svědčit o dosažení kompletní léčebné odpovědi [50]. Vzhledem k různým biologickým poločasům jednotlivých markerů je nutno správně volit intervaly odběrů krve k vyšetření tak, aby se skutečně postihl efekt terapie a nikoliv cytolytický fenomén. Při hodnocení dynamiky změn nádorových markerů ve vztahu ke klinickému průběhu onemocnění je vhodné dodržovat doporučenou frekvenci vyšetření [48]. Doporučené časové intervaly kontrolních odběrů dle WHO jsou 1. rok 1x měsíčně, 2. rok 1x za 2 měsíce, 3. rok 1x za 3 měsíce. Příležitostné indikování a vyšetřování nádorových markerů není smysluplné [47].

**Tabulka 1. Nádorové markery a jejich využití**

Typ nádoru	Hlavní marker	Vedlejší markery
Tlusté střevo, rektum	CEA, CA 19-9	CA 50, CA 9
Žaludek	CEA, CA 19-9	CA 50, CA 72-4
Pankreas	CA 19-9	CA 50, CA 125
Prs	CA 15-3	CA 125, MCA, CEA
Plíce, malobuněčný (SCLC)	NSE	CEA
Plíce, nemalobuněčný (nSCLC)	SCCA, CYFRA 21-1	
Ovarium	CA 125	CA 72-4
Germinální nádory	hCG, AFP	
Játra	AFP	CA 50
Děloha	SCCA	CEA
Močový měchýř	TPA	
Prostata	PSA	

## 2.6.4 Rozdělení nádorových markerů



Obr. 3. Dělení nádorových markerů podle místa produkce a detekce

## 2.6.5 Charakteristika vybraných nádorových markerů

### 2.6.5.1 Humorální nádorové markery

#### 2.6.5.1.1 Onkoplacentární antigeny

Lidský choriový gonadotropin (hCG) byl popsán v moči těhotných žen již v roce 1928 jako látka placentárního původu s gonadotrofními účinky.

Je to glykoprotein tvořený podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ . Fyziologicky je produkován trofoblastem a placentou s maximem v 10. až 12. týdnu těhotenství. Jeho funkcí je udržovat žluté tělísko, stimulovat tvorbu progesteronu, inhibičním efektem na T-lymfocyty podporovat imunotoleranci plodu.

hCG se nejčastěji stanovuje pro časnou diagnózu těhotenství (včetně mimoděložního), hrozícího potratu a hydatiózní moly a je také jedním z kritérií při screeningu vrozených vývojových vad. Falešná pozitivita je popisována u myomů a ovariálních cyst. V onkologii je specifitější vyšetřování volné  $\beta$ -podjednotky ( $\beta$ hCG). Zvýšené hodnoty svědčí pro přítomnost nádoru trofoblastického nebo germinálního původu, tj. nádorů varlat, ovarií, choriokarcinomů, hydatiózní moly, méně často nádorů pankreatu, plic a GIT. Bylo popsáno zvýšení hCG také u nádorů prsu a ledvin. hCG má význam diagnostický, prognostický i pro hodnocení efektu terapie [48].

#### 2.6.5.1.2 Onkofetální antigeny

##### Karcinoembryonální antigen

Karcinoembryonální antigen (CEA) je onkofetální antigen vázaný na povrchovou membránu buněk. Za fyziologických podmínek probíhá jeho intenzivní produkce u plodu, nejvyšší hodnoty nabývají kolem 22. týdne. Vzhledem k možnému transplacentárnímu přechodu může být jeho sérová hladina zvýšena u malého procenta gravidních žen.

Zvýšená hodnota v séru se může vyskytovat u kuřáků, při zánětlivých procesech gastrointestinálního traktu i plic, u hepatitid, cirhóz, pankreatitid i u autoimunitních chorob. Při diagnostice nádorových onemocnění nacházíme zvýšenou hladinu v séru u kolorektálního karcinomu (zde má i prognostický význam) a dále u karcinomů žaludku, jater, pankreatu, plic a prsu.

### **Alfa1-fetoprotein**

Alfa1-fetoprotein (AFP) je onkofetální antigen glykoproteinového charakteru, který je podobný albuminu.

Za fyziologických podmínek je tvořen fetálními játry a žloutkovým váčkem a přechází do krve gravidních žen. Výrazné změny jeho koncentrace v séru během těhotenství mohou indikovat fetální malformace (Downův syndrom, rozštěpové vady).

Ke zvýšení sérové hladiny dochází u hepatoblastomu (u dětí), hepatocelulárního karcinomu nebo teratogenního nádoru testes nebo ovaria. Méně často dochází ke zvýšení AFP u nádorů pankreatu, bronchogenního karcinomu a kolorektálního karcinomu. K mírnému zvýšení hladiny AFP dochází při hepatitidách nebo toxickém poškození jater. AFP je nádorovým markerem 1. volby pro karcinom jater [48].

#### **2.6.5.1.3 Komplexní glykokonjugáty (glykoproteiny či glykolipidy definované hybridomovou technikou)**

Jsou to glykoproteiny, event. glykolipidy, které jsou rovněž produkovány určitými buňkami plodu; bývají tedy obvykle řazeny k onkofetálním antigenům. Při jejich odhalení se vycházelo z předpokladu, že nádorové buňky do krevního oběhu uvolňují antigenní struktury, které lze v krvi prokázat. Homogenáty zhoubných nádorů byla imunizována laboratorní zvířata a po izolaci vhodných linií imunokompetentních buněk byly hybridomovou technikou připraveny buněčné linie produkující monoklonální protilátky proti glykoproteinovým strukturám na povrchu nádorových buněk. Tyto protilátky pak byly použity k detekci tumorových antigenů v séru pacientů. Většina těchto antigenů je značena písmeny CA (carbohydrate antigen) a čísly podle označení buněčné linie, jež produkuje příslušnou protilátku [50].

#### **CA 15-3**

CA 15-3 byl prvním cirkulujícím mucinovým glykoproteinem, bývá produkován především nádory žlázového epitelu a epitelu mléčné žlázy [48].

CA 15-3 je citlivým markerem pro karcinom prsu, kde jeho senzitivita dosahuje 50-80 %. V případě ovariálního karcinomu dosahuje jeho senzitivita 50 %, u ostatních nádorů je podstatně nižší. U karcinomu prsu odpovídá jeho výskyt klinickému stádiu, stádium I – 9 %, stádium II – 19 %, stádium III – 38 %, stádium IV – 75 % [49].

Je vhodný pro detekci relapsu vzhledem k časnému záchytu návratu choroby – až 6 měsíců před klinickou manifestací. Bývá doplňován sledováním CEA a proliferačního markeru TPA, zejména pro rozpoznání kostních metastáz [48].

### **CA 19-9**

CA 19-9 je glykoproteinový antigen mucinózního typu příbuzný antigenu krevní skupiny Lewis H. Asi 5-10 % populace tento antigen neprodukuje, protože jim chybí enzym fukozyltransferáza. Je eliminován výhradně žlučí, proto i mírná cholestáza může zvýšit jeho hodnoty v séru nad normu. Až 20 % nemocných s benigními afekcemi v oblasti hepatobiliární a pankreatické má zvýšenou hodnotu tohoto markeru, v případě obstrukční žloutenky až 40 %. U benigních onemocnění střeva, žaludku, a ovarií bývá zvýšen v 5-10 %. CA 19-9 je senzitivním nádorovým markerem u dobře diferencovaných karcinomů pankreatu (70-95 %), žlučových cest (55-79 %), jater (22-51 %), žaludku (26-60 %), kolorektálního karcinomu (18-58%), mucinózní karcinomy ovaria, vzácně též karcinomy endocervixu, plic i mléčné žlázy. V málo diferencovaných karcinomech je jeho produkce nižší a úplně chybí u aplastických nádorů [48].

### **CA125**

CA 125 je diferenciační antigen, který je fyziologicky produkován ve fetálním coelomovém epitelu. Zvýšená hladina CA 125 v séru byla pozorována u benigních afekcí ovarií a endometria, u hepatopatií, pankreatitid, dráždění peritonea a pleury, dále fyziologicky v těhotenství nebo v průběhu menstruace. Screening CA 125 je doporučován především u žen s dědičným syndromem ovariálního karcinomu.

Sérová hladina CA 125 je významná především pro sledování efektu terapie a pro dlouhodobé monitorování nemocných s karcinomem ovarií, především nemucinózního typu, tj. u serózních a nediferencovaných karcinomů ovaria. Vysoké hodnoty, které se po primární terapii nesníží, jsou indikací k reoperaci. Zvýšené koncentrace byly pozorovány rovněž u karcinomů endometria i dalších gynekologických malignit, dále u karcinomů prsu, pankreatu a plic. Zvýšená hladina CA 125 u karcinomu prsu může signalizovat plicní metastázy, obzvláště v kombinaci s pleurálním výpotkem. Zvýšená koncentrace CA 125 v séru koreluje s velikostí nádoru ovarií. Při velikosti tumoru do 2 cm je senzitivita 24 %, nad 2 cm 63 %. V případě karcinomu ovarií koreluje velmi dobře s klinickým stádiem. Ve stádiu I a II je senzitivita 44-60 %, ve stádiu III a IV 78-100 % [48].

### **CA 72-4**

CA 72-4 je glykoprotein mucinového typu. Fyziologická produkce CA 72-4 je významná v epiteliálních buňkách orgánů zažívacího traktu v embryonálním období. Byl prokázán i v dospělé tkáni plic, genitálního traktu a zažívacích orgánů. CA 72-4 je produkován a v určitém nízkém procentu prokazován i v séru nemocných s benigním postižením žaludku, střeva a mléčné žlázy.

Sérový CA 72-4 je významný především pro sledování maligního onemocnění žaludku, kde vykazuje vyšší senzitivitu než CEA nebo CA 19-9 [48]. Diagnostická senzitivita v závislosti na klinickém stadiu je u karcinomu žaludku 28 až 80 %. Pro toto onemocnění představuje marker první volby. Je vysoce specifický 92-95 % a odliší maligní od benigních onemocnění [49]. Je rovněž vhodný pro sledování průběhu onemocnění karcinomu dolní třetiny jícnu, tlustého střeva a pankreatu, event. mucinového typu ovariálního karcinomu. Vhodně doplňuje sledování nemocných s nádory trávicího traktu, kteří mají krevní skupinu Lewis a-/b- (5-10 % populace), a proto neprodukují CA 19-9 [48].

### **CA 50**

CA 50 je monoklonální protilátkou definovaný mucin-glykolipidový antigen strukturálně podobný CA 19-9. Na rozdíl od CA 19-9 je antigen CA 50 produkován i osobami s krevní skupinou Lewis a-/b-.

Fyziologická produkce CA 50 probíhá už v době vývoje plodu, o čemž svědčí jeho přítomnost v mekóniu. Ve velmi malém množství je tento antigen přítomen v epitelu žaludku, žlučníku a pankreatu u zdravých dospělých [47]. Jeho vyšetření má význam především pro nemocné s karcinomem pankreatu i dalších karcinomů GIT a u gynekologických nádorů (karcinomy těla a hrdla děložního) [48].

**Tabulka 2. Fyziologické hodnoty nádorových markerů a nemaligní příčiny jejich zvýšení.**

Marker	Fyziologické hodnoty	Nemaligní příčiny zvýšení NM
CEA	< 5µg/l	zánětlivé choroby jater, ledvin, jaterní cirhóza, pankreatitida
AFP	< 10 µg/l	jaterní cirhóza, akutní i chronická hepatitida, zánětlivé procesy plic, ledvin, zažívacího traktu
CA 19-9	< 37 kU/l	cirhóza jater, cholelitiáza, chronická hepatitida, akutní a chronická pankreatitida, choroby žluč. cest, diabetes
CA 125	< 35 kU/l	ovariální cysty, záněty adnex, choroby jater, pankreatu, žlučníku, výpotky
CA 15-3	< 30 kU/l	jaterní cirhóza, akutní hepatitida, postižení glomerulů
CYFRA 21-1	< 3,3 µg/l	nemoci urologického traktu, myomy, ovariální cysty
TPA	< 120 U/l	infekční procesy obecně, jaterní cirhóza, pankreatitida
PSA	< 4 µg/l	benigní hyperplazie, záněty prostaty
SCCA	< 2 µg/l	záněty plic, poruchy ledvin, jater
hCG	< 10 U/l	mola hydatiíza

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, zda hladina autoprotilátek proti aktivačnímu peptidu lidského prokathepsinu D může být použita pro diagnostické účely a to především jako nový tumorový marker. K tomu bylo třeba vypracovat a optimalizovat metodu pro měření autoprotilátek proti aktivačnímu peptidu lidského kathepsinu D u různých skupin populace. Po vypracování této metody bylo úkolem analyzovat přítomnost autoprotilátek v séru pacienta a tento výsledek korelovat s jeho zdravotním stavem. Dále byl sledován vliv neovlivnitelných faktorů (pohlaví, věk) na výsledek měření. U všech získaných výsledků bylo úkolem provést statistickou analýzu.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál a metodika

#### 4.1.1 Materiál

##### 4.1.1.1 Vzorky pacientů

Pro stanovení hladiny autoprotilátek proti aktivačnímu peptidu lidského prokathepsinu D (AP pCD) byla použita čerstvá séra pacientů, která byla získána z Všeobecné fakultní nemocnice v Praze z Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky. Pro hodnocení výsledků bylo použito standardní sérum, ke kterému byly vztahovány výsledky analýzy sér pacientů. Výsledek měření je vyjádřen jako poměr množství autoprotilátek v séru pacienta ku množství autoprotilátek ve standardním séru.

Před vlastním měřením byly vzorky zpracovány. Nejdříve byla provedena centrifugace při 1 500 otáčkách/min. po dobu 10 minut na ultracentrifuze Beckmann při teplotě 4°C a následně z každého séra byly rozpipetovány 3 podíly po 200 µl, které byly zamraženy při teplotě -25°C.

##### 4.1.1.2 Přístroje

Analytické váhy	Sartorius, Německo
Magnetická míchadla	Ikamag, Jenway
Míchadla	Labor. přístroje Praha, ČR
pH metr	Hach, Německo
Předvážky	Nagata, Taiwan
Rainbow ELISA reader	SLT, Rakousko
Termostat na mikrotitrační destičky	Tool, Francie
Třepačky	Elpan, RT60, ČR
Ultracentrifuga	Beckmann, USA
Vortex	Velp Scintifica, Itáli

#### 4.1.1.3 Nástroje

Pipety (10-100 $\mu$ l a 100-1000 $\mu$ l)	Eppendorf, Germany
Pipeta 8-kanálová (20-200 $\mu$ l)	Socorex, Švýcarsko

Dále byly použity běžné laboratorní pomůcky.

#### 4.1.1.4 Chemikálie

Albumin, hovězí sérový (Minimum 98 % - suitable as diluent in ELISA applications), SIGMA, USA

Citrát sodný,	LACHEMA, ČR
Dihydrogenfosforečnan draselný	LACHEMA, ČR
Hydrogenfosforečnan sodný	LACHEMA, ČR
Hydrogenuhličitan sodný	LACHEMA, ČR
Hydroxid sodný	LACHEMA, ČR
Chlorid draselný	PENTA, ČR
Chlorid sodný	PENTA, ČR
Kyselina fosforečná	LACHEMA, ČR
Kyselina chlorovodíková	LACHEMA, ČR
Kyselina sírová	LACHEMA, ČR
o-Fenylendiamin	SIGMA, USA
Tween 20	SIGMA, USA
Uhličitan sodný	LACHEMA, ČR
Peroxid vodíku 30%	PENTA, ČR

#### 4.1.1.5 Mikrotitrační destičky

MaxiSorp <sup>TM</sup> Surface (96 jamek)	NUNC, Dánsko
---	--------------

#### 4.1.1.6 Sekundární protilátka

SwAHu/IgG Px (1 ml)	SEVAPHARMA a.s., ČR
---------------------	---------------------

Jedná se o prasečí protilátku proti lidskému IgG, která je značená peroxidasou.

#### **4.1.1.7 Antigen aktivačního peptidu lidského prokathepsinu D**

K potažení mikrotitrační destičky se používá připravená sekvence posledních 15 aminokyselin z aktivačního peptidu lidského prokathepsinu D (sekvence PVSKYSQAVPAVTEG), která byla syntetizována na zakázku v Polypeptide s r.o. v Praze. Jedná se o takzvaný MAP (multiple antigenic peptide), jehož základ tvoří imunogenně inertní rozvětvené lysinové jádro, na které je paralelně syntetizován peptid. Výsledkem syntézy je trojrozměrná molekula s vysokým molárním poměrem antigenu peptidu vůči jádru molekuly a proto není nutné použít jiný nosič, který by vyvolal protilátkovou odpověď. Každé jádro molekuly může obsahovat čtyři identické peptidy. Výhodou MAP je vysoká imunogenita a koncentrace antigenu.

#### 4.1.2 Příprava roztoků

1. **vazebný roztok (0,05M karbonát-bikarbonátový pufr), pH=9,6**

1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

2,93 g NaHCO<sub>3</sub>

doplnit do 1000 ml deionizovanou vodou, pH upravit pomocí kyseliny chlorovodíkové

2. **PBS pufr, pH=7,4 (10krát koncentrovaný roztok)**

80 g NaCl

29 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O

2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2 g KCl

doplnit do 1000 ml destilovanou vodou, pH upravit pomocí hydroxidu sodného

3. **promývací roztok**

1000 ml PBS

0,5 ml Tween 20

4. **blokovací roztok (1% BSA v PBS)**

100 ml PBS

1 g BSA

5. **ředící roztok (0,5% BSA v PBS)**

100 ml PBS

0,5 g BSA

6. **substrátový roztok (citrát-fosfátový pufr), pH = 5,0**

14,7 g citrát sodný

500 ml destilované vody

pH upravit pomocí kyseliny fosforečné

7. **zastavovací roztok (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)**

111,6 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

888,4 ml destilované vody

### 4.1.3 Laboratorní postup

#### 1. Příprava čerstvého roztoku antigenu aktivačního peptidu prokathepsinu D

2 mg lyofilizovaného AP pCD bylo rozpuštěno v 1ml PBS. Z tohoto zásobního roztoku (2mg/ml) byly připraveny 4 podíly po 250  $\mu$ l a ponechány při 4°C v ledničce.

Ze zásobního roztoku byl odebráno 25  $\mu$ l roztoku a doplněno do 1 ml PBS a tím byl připraven pracovní roztok o koncentraci 0,05 mg/ml.

Přidáním 100  $\mu$ l pracovní roztoku AP prokathepsinu D do 10 ml vazebného roztoku o pH = 9,6 získáme roztok, který se nanáší na destičku.

Do každé jamky nanést 100  $\mu$ l připraveného roztoku (výsledná koncentrace AP pCD byla 0,0005 mg/ml).

#### 2. Inkubace 1 hodinu při 37°C.

#### 3. Promývání

Promývání se provede 3krát po 200  $\mu$ l na jamku. První promývání se nechá 5 minut třepat na třepačce. U dalšího promývání již třepání není třeba.

#### 4. Blokovací fáze

Nanést 150  $\mu$ l blokovacího roztoku (1% BSA v PBS) do každé jamky mikrotitrační destičky.

#### 5. Inkubace 1 hodinu při 37°C

#### 6. Promývání

Promývání se provede 3krát po 200  $\mu$ l na jamku. První promývání se nechá 5 minut třepat na třepačce. U dalšího promývání již třepání není třeba.

#### 7. Aplikace vyšetřovaných vzorků

Séra naředit v 0,5% BSA v PBS v poměru 1:25. Nanést 100  $\mu$ l do každé jamky. Sérum pacienta měřeno ve třech a standardní sérum v osmi jamkách destičky.

## **8. Inkubace 1 hodinu při 37°C**

## **9. Promývání**

Promývání se provede 3krát po 200 µl na jamku. První promývání se nechá 5 minut třepat na třepačce. U dalšího promývání již třepání není třeba.

## **10. Aplikace protilátky proti lidskému IgG značená peroxidásou**

Naředit protilátku v poměru 1: 10 000 v 0,5 % BSA v PBS. Nanést 100 µl do každé jamky.

## **11. Inkubace 1 hodinu při 37°C**

## **12. Promývání**

Promývání se provede 3krát po 200 µl na jamku. První promývání se nechá 5 minut třepat na třepačce. U dalšího promývání již třepání není třeba.

## **13. Aplikace substrátu**

Ke 40 ml substrátového roztoku přidat 40 µl 30% peroxidu vodíku a 1krát 20mg tabletu o-fenylendiaminu. Substrát připravit těsně před použitím. Nanést 100 µl do každé jamky.

## **14. Inkubace 10 minut při 37°C**

## **15. Zastavení reakce**

Reakci zastavit přidáním 50 µl 2M kyseliny sírové do každé jamky.

## **16. Změřit absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce 492nm.**

## **17. Zpracování naměřených výsledků**

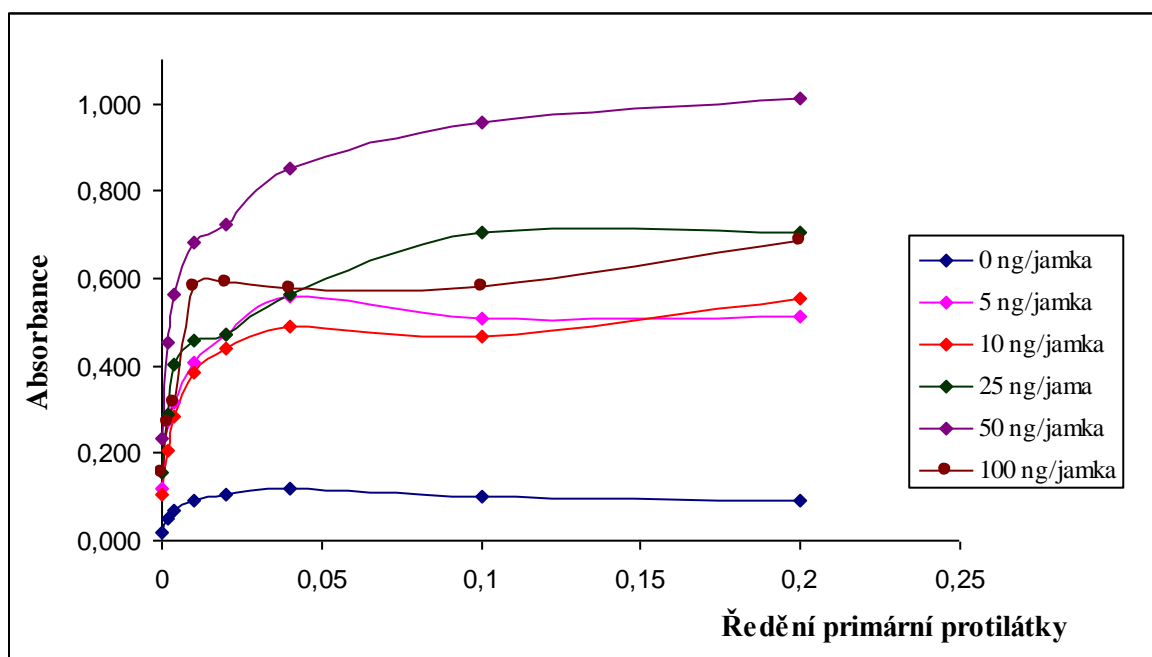
Pro každé sérum pacienta byly získány 3 hodnoty absorbance, z nichž byla vypočítána průměrná hodnota a relativní směrodatná odchylka. Pokud relativní směrodatná odchylka překročila 5%, byl vzorek znovu přeměřen. Pokud i po přeměření překračoval tuto hodnotu, byl z analýzy vyřazen. Pro standardní sérum byla určena průměrná hodnota z osmi absorbancí a poté byl spočítán poměr absorbancí séra pacienta ke standardnímu séru.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Optimalizace metody

#### 5.1.1 Koncentrace antigenu

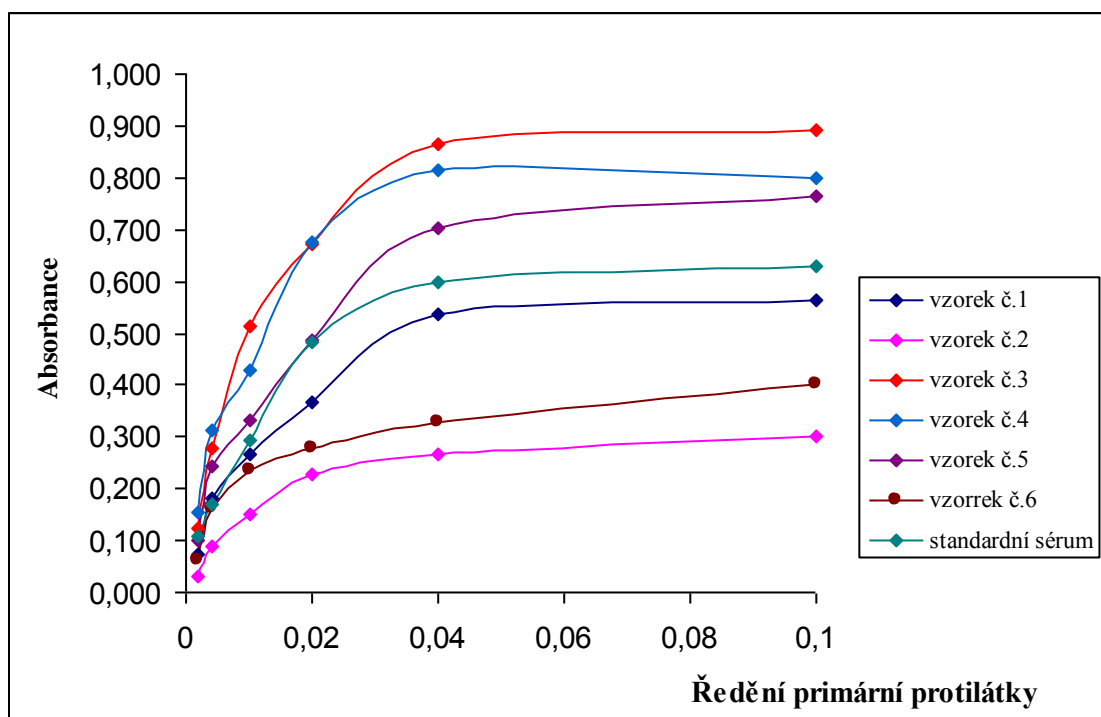
Byl testován vliv šesti různých koncentrací antigenu (aktivační peptid pCD vázaný na polylysinový stromeček). Výsledné množství antigenu v jedné jamce bylo 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng a 1 ng. Z následující tabulky vyplývá, že nejvhodnější koncentrace antigenu je 50 ng/jamka, neboť získaná hodnota absorbance je v tomto případě největší, což svědčí o zaplnění většiny vazebných míst pro antigen přítomných na dně jamky mikrotitrační destičky. Při použití vyšší koncentrace zřejmě nedochází k navázání všech molekul antigenu na destičku z důvodu jejich nadměrného množství a možné vzájemné interakce, proto při použití koncentrace 100 ng/jamku je výsledný signál nižší.



**Obr. 4.** Vliv koncentrace antigenu a primární protilátky na výslednou absorbanci roztoku. (koncentrace sek. protilátky: 0,10  $\mu\text{g/ml}$ , teplota: 37°C, saturace: 1% BSA).

### 5.1.2 Koncentrace primární protilátky (ředění séra)

Testovali jsme vliv ředění sér na výslednou absorbanci roztoku. Séra byla naředěna 10krát, 25krát, 50krát, 100krát, 250krát a 500krát. Výsledná závislost je znázorněna v následujícím grafu. Koncentrace protilátek IgG v sérech pacientů je neznámá, proto je v grafu na ose x vyneseno pouze ředění primární protilátky. Pro další použití bylo zvoleno ředění séra 25krát, neboť při tomto ředění je rozdíl absorbance mezi jednotlivými séry nejzřetelnější a je proto vhodný pro následný screening sér.

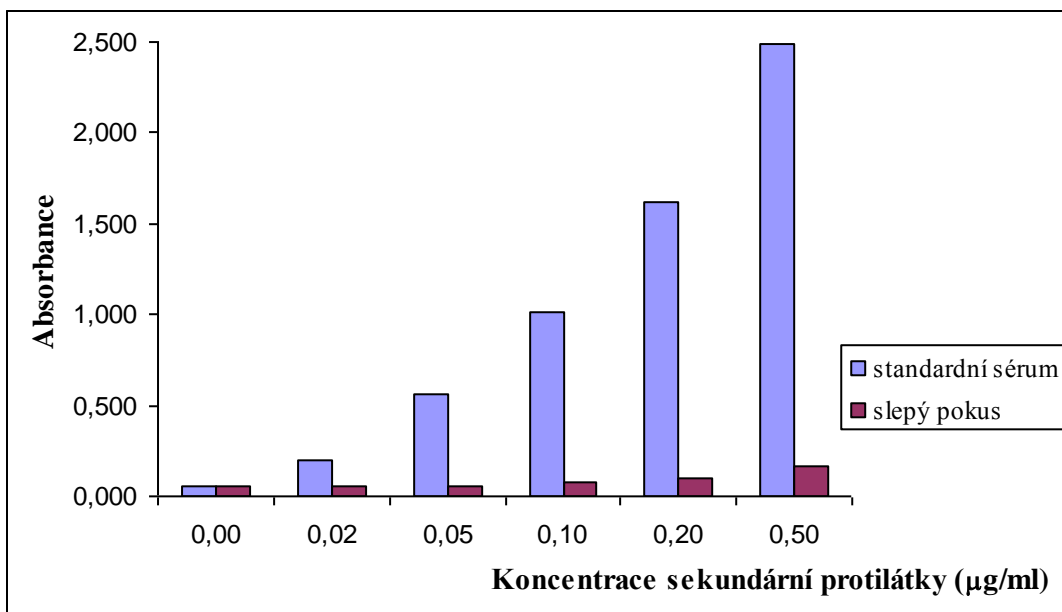


**Obr. 5. Vliv koncentrace primární protilátky na výslednou absorbanci roztoku.** (koncentrace antigenu: 50 ng/jamka, koncentrace sek. protilátky: 0,10  $\mu\text{g/ml}$ , teplota: 37°C, saturace:1% BSA).

### 5.1.3 Koncentrace sekundární protilátky

Bylo testováno celkem sedm ředění sekundární protilátky SwAHu/Px a to 1:50 000 (0,02  $\mu\text{g/ml}$ ), 1:20 000 (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ), 1:10 000 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ), 1: 5 000 (0,2  $\mu\text{g/ml}$ ), 1:2 000 (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) a nulová koncentrace. Následující graf znázorňuje vliv tohoto ředění na výslednou absorbanci při použití standardního séra. Pro další použití bylo zvoleno ředění 1:10 000 (koncentrace 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ), neboť absorbance se v tomto případě pohybuje kolem 1 a hodnota slepého roztoku je dostatečně nízká v porovnání s ředěními 1:5 000 a 1:2 000.



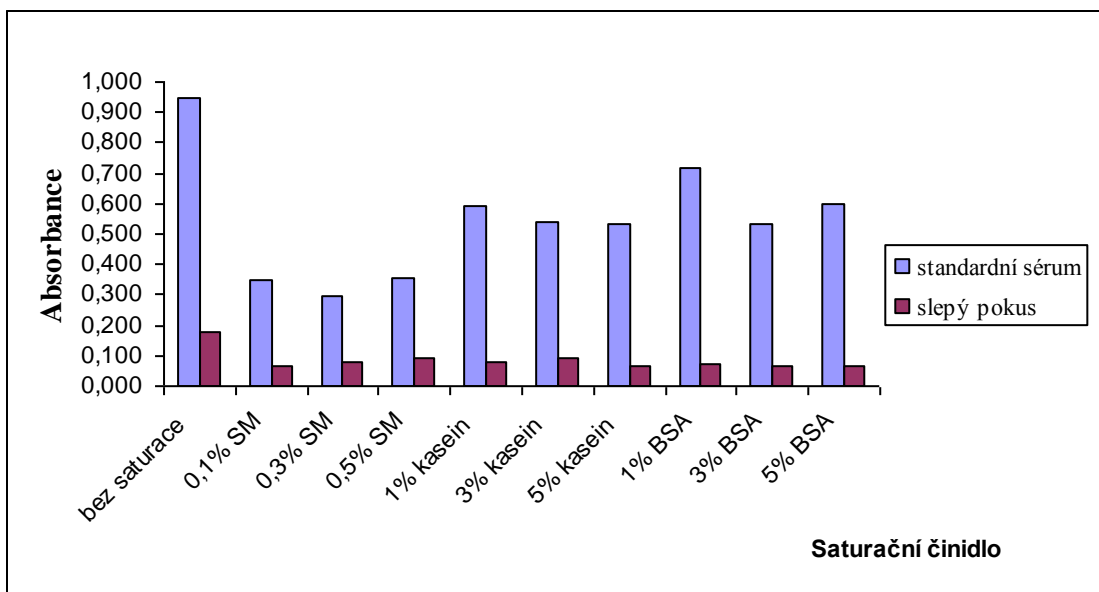


**Obr. 6. Vliv koncentrace sekundární protilátky na výslednou absorbanci roztoku.** (koncentrace antigenu: 50 ng/jamka, ředění séra 1:25, teplota: 37°C, saturace: 1% BSA).

#### 5.1.4 Druh a koncentrace saturačního činidla

Byly testovány tři druhy saturačních činidel ve třech různých koncentracích: BSA (1%, 3% a 5%), kasein (1%, 3% a 5%) a odtučněné sušené mléko (0,1%, 0,3% a 5%). Následující graf zobrazuje získané hodnoty absorbancí standardního séra a slepého pokusu v závislosti na použitém saturačním činidle. Jako nejvhodnější činidlo se jeví 1% BSA, které je také nejčastěji používané v podobných aplikacích, neboť absorbance slepého pokusu je dostatečně nízká a současně absorbance vzorku není saturačním činidlem příliš ovlivněna, jak je tomu např. při použití sušeného mléka.

Při testování různých saturačních činidel bylo zjištěno, že velký vliv na průběh pokusu má i typ použitého BSA. Pokusy s BSA určeného pro elektroforézu (A-7906) vykazovaly značně vyšší hodnotu absorbance slepého roztoku a celkovou nestabilitu systému oproti pokusům, při nichž bylo použito BSA určené pro ELISA aplikace (A-7030).



**Obr. 7. Vliv saturačního činidla na výslednou absorbanci roztoku.**

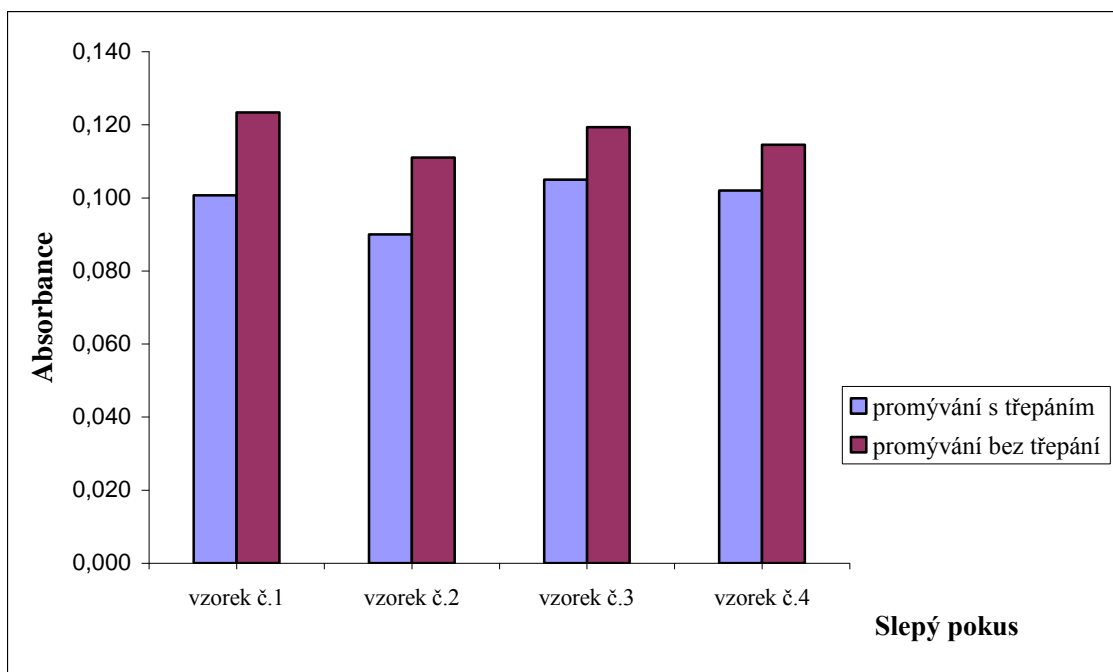
(koncentrace antigenu: 50 ng/jamka, koncentrace sekundární protilátky 0,1 µg/ml , ředění séra 1:25, teplota: 37°C).

### 5.1.5 Délka inkubací, substrátové reakce a promývání

Pro zjištění vhodné inkubační doby byla mikrotitrační destička inkubována s antigenem, primární a sekundární protilátkou po dobu 30 min, 60 min a 120 min a naměřené absorbance byly poté porovnány. Bylo zjištěno, že mezi inkubací po dobu 60 min a 120 min neexistuje významný rozdíl ve výsledné absorbanci. Oproti tomu inkubace po dobu 30 min neumožňuje navázání všech protilátek (popř. antigenu), což se projevuje téměř poloviční hodnotou absorbance.

Délka substrátové reakce byla zvolena 10 min, neboť po tomto čase již nebyla pozorována žádná změna ve zbarvení roztoku v jamkách mikrotitrační destičky.

Promývání způsobem, kdy během první aplikace promývacího pufru se destička nechala 5 min třepat, se ukázalo účinnější než obvyklé promývání. Hodnota absorbance slepého roztoku výrazně poklesla (obr. 8).



**Obr. 8. Vliv způsobu promývání na výslednou absorbanci slepého roztoku.**

Pro vyloučení vlivu působení tweenu obsaženého v promývacím pufru na průběh substrátové reakce byl proveden pokus, ve kterém byl pro poslední promývání před přidáním substrátu použit promývací roztok bez tweenu. Ukázalo se, že absorbance se nezměnila, teda tween substrátovou reakci neovlivňuje.

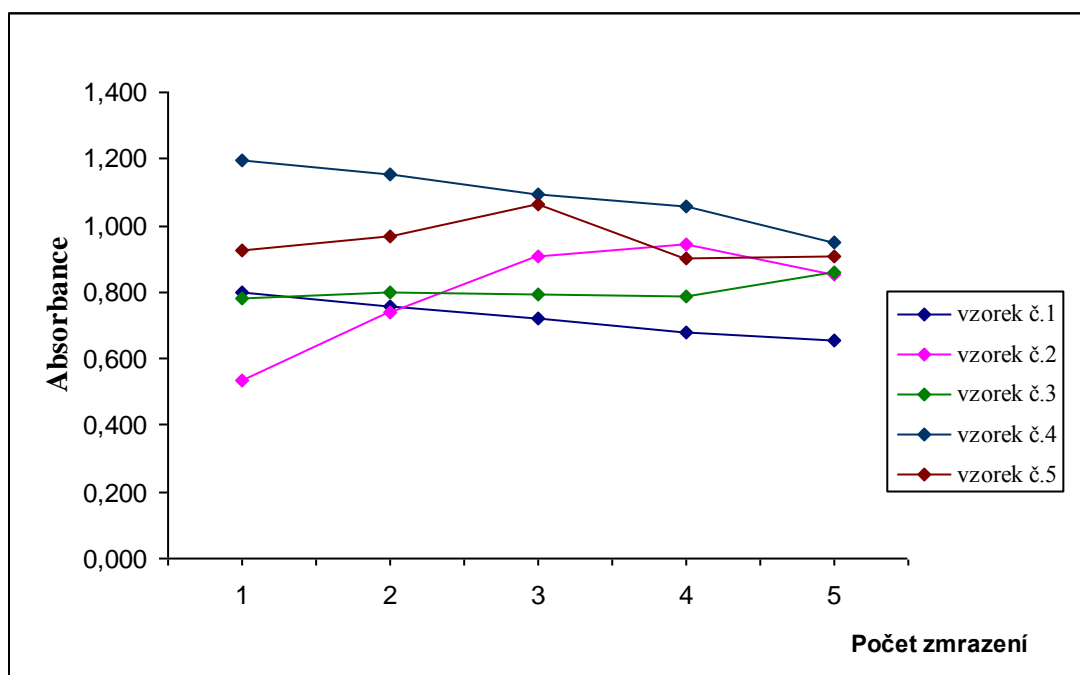
### 5.1.6 Teplota a třepání během inkubace

Byly testovány dvě teploty, za kterých byla prováděna ELISA metoda (25°C a 37°C). Lepších výsledků bylo dosaženo při teplotě 37°C, což jsme předpokládali, neboť tato teplota odpovídá teplotě, za které protilátky v lidském organismu působí a její snížení má zřejmě na jejich vazbu negativní vliv.

Při porovnání inkubace, při níž byly destičky podrobeny třepání, a inkubace bez třepání jsme zjistili, že vyšší absorbance bylo dosaženo v druhém případě, přestože rozdíl nebyl příliš značný. Toto svědčí zřejmě o velmi specifické, avšak poměrně slabé vazbě mezi antigenem a primární protilátkou obsaženou v séru. Pro další měření jsme zvolili metodu bez třepání, aby nedošlo k ovlivnění výsledků tímto způsobem.

### 5.1.7 Vliv skladování sér na hladinu autoprotilátek proti AP pCD

Jak je vidět z následujícího grafu, se stoupajícím počtem zmrazení a rozmrazení sér se hladina autoprotilátek proti AP pCD výrazně mění. Dochází jak k jejímu poklesu, způsobeném pravděpodobně jejich rozkladem, tak u některých sér i ke zvýšení této hladiny. Příčinou tohoto zvýšení je zřejmě shlukování některých komponent obsažených v séru společně s protilátkami. Shluky byly u některých několikanásobně zmrazených sér patrné i při pozorování pouhým okem.



Obr. 9. Vliv zmrazování sér na hladinu autoprotilátek proti AP pCD v séru.

### 5.2 Opakovatelnost a reprodukovatelnost metody

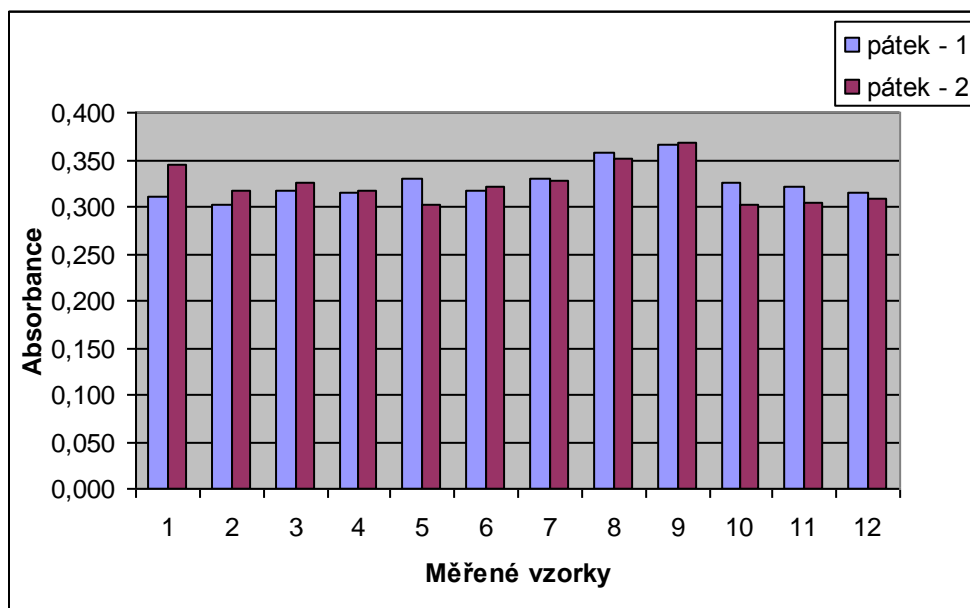
Přesnost metody je definována jako míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek.

Při vyhodnocení přesnosti ELISA metody byla sledována přesnost v sérii (opakovatelnost) a dále přesnost v čase (reprodukovatelnost). Bylo provedeno měření stejných vzorků paralelně na dvou mikrotitračních destičkách během jednoho dne a v průběhu dalších tří dnů (pondělí, středa, pátek), abychom zjistili, zda mezi výsledky získanými opakovaným měřením není statisticky významný rozdíl.

U získaných výsledků jsme sledovali nepřesnost měření vyjádřenou směrodatnou odchylkou a relativní směrodatnou odchylkou (variačním koeficientem). Následně bylo provedeno statistické vyhodnocení získaných výsledků.

### 5.2.1 Opakovatelnost metody

Následující graf zobrazuje výsledky měření vzorků, které bylo provedeno za stejných podmínek paralelně na dvou mikrotitračních destičkách během jednoho dne.



**Obr. 10. Opakované měření vzorků paralelně na dvou mikrotitračních destičkách.**

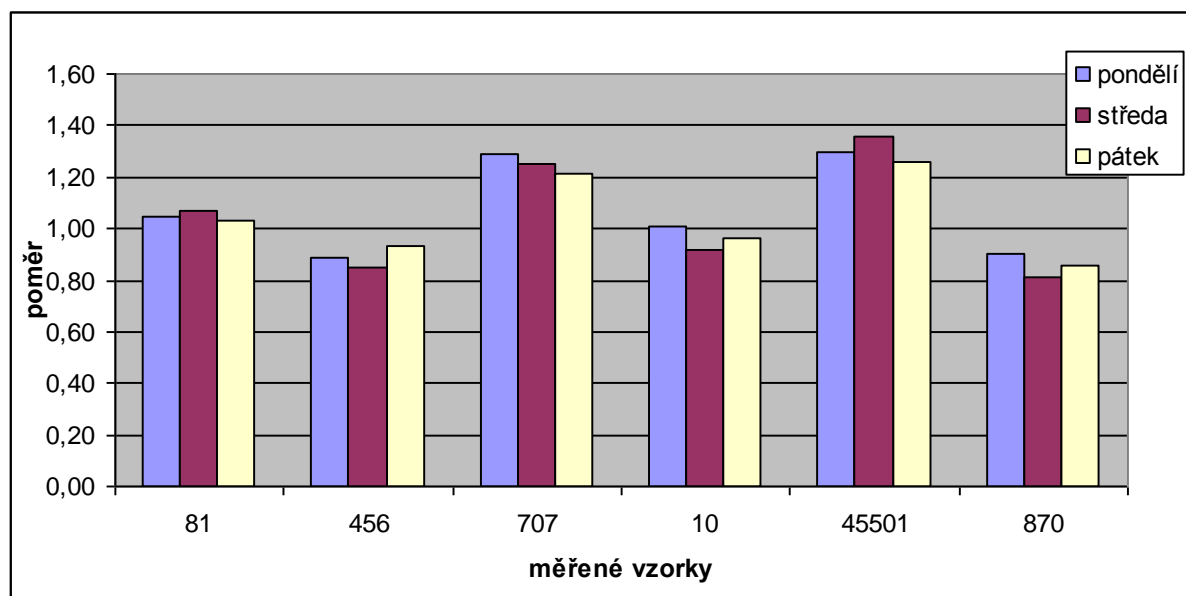
Naměřené výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí párového t-testu, jehož cílem bylo zjištění statistické významnosti rozdílu mezi naměřenými výsledky.

**Tabulka 3. Test významnosti rozdílu výsledků měření provedených na dvou mikrotitračních destičkách.**

Test významnosti rozdílu	
t-statistika	0,004907477
Počet stupňů volnosti	11
Kritická hodnota	2,20098516
Závěr	<b>Rozdíly jsou NEVÝZNAMNÉ</b>
Pravděpodobnost	0,420788741
Korelační koeficient	0,9523418031

### 5.2.1.1 Reprodukovatelnost metody

Pro zjištění reprodukovatelnosti metody bylo provedeno opakované měření šesti vzorků v průběhu tří dnů (pondělí, středa, pátek). Výsledky jsou zobrazeny v následujícím grafu. Je patrné, že mezi jednotlivými měřeními téhož vzorku ve třech různých dnech, jsou mírné rozdíly. Z tohoto důvodu bylo provedeno statistické zhodnocení významnosti těchto rozdílů. Párovým t-testem byla potvrzena nevýznamnost tohoto rozdílu.



**Obr. 11. Opakované měření vzorků ve třech různých dnech.**

Na ose y je poměr, který odpovídá poměru aritmetického průměru absorbancí daného vzorku k aritmetickému průměru absorbancí standardního vzorku.

**Tabulka 4. Test významnosti rozdílu výsledků měření v průběhu tří dnů.**

Test významnosti rozdílu			
porovnání	pondělí - středa	pondělí - pátek	středa – pátek
t-statistika :	0,073484692	0,077567175	0,004082483
Počet stupňů volnosti :	5	5	5
Kritická hodnota :	2,570581836	2,570581836	2,570581836
Závěr :			
<b>Rozdíly jsou</b>	<b>NEVÝZNAMNÉ</b>	<b>NEVÝZNAMNÉ</b>	<b>NEVÝZNAMNÉ</b>
Pravděpodobnost :	0,137609866	0,05580535	0,477498247
Korel. koef. R(x,y) :	0,976959215	0,980872327	0,99063758

### 5.3 Statistické zpracování získaných dat

Při statistickém zpracování získaných dat byla nejdříve provedena explorativní analýza, při níž bylo sledováno statistické chování naměřených dat.

Pomocí základní analýzy dat bylo sledováno, zda:

- soubor má normální rozdělení
- existují odlehlé hodnoty,
- symetrie rozdělení (šikmost a špičatost).

Normální rozdělení dat souboru bylo testováno pomocí Anderson-Darlingova testu normality. Pomocí tohoto testu se dá určit, zda soubor dat odpovídá zvolenému rozdělení, v tomto případě normálnímu rozdělení. Výsledek je vždy uveden v horní části tabulky u histogramu. Pokud je hodnota pravděpodobnosti menší než zvolená hladina významnosti ( $\alpha=0.05$ ), soubor dat neodpovídá normálnímu rozdělení.

Existence odlehlých hodnot byla sledována na box-plotu (krabicovém grafu). Krabicový graf představuje grafickou formu rozdělení naměřených hodnot. Z krabicového grafu můžeme zjistit medián, horní a dolní kvartil a také existenci odlehlých hodnot. Medián odpovídá střední příčce, z jejíž polohy je možné zjistit symetrii rozdělení naměřených hodnot. Protilehlé strany obdélníku jsou na úrovni horního a dolního kvartilu. V oblasti vymezené horním a dolním kvartilem leží 50% všech výsledků. Z obdélníku vychází úsečky, které končí v nejvzdálenější pozorované hodnotě ve vzdálenosti 1,5 násobku mezikvartilového rozpětí od přílehlého kvartilu. Body vyznačené mimo tyto úsečky jsou hodnoty mimořádně odlehlé od mediánu, většinou je považujeme za odlehlé hodnoty. V případě, že při statistickém hodnocení byla zjištěna přítomnost odlehlých hodnot, můžeme postupovat dvěma způsoby. Prvním způsobem spočívá v jejich vyloučení z analýzy, což však není vždy nejvhodnějším řešením. Mezi pacienty se vyskytuje individuální variabilita, proto může dojít k tomu, že se při měření objeví výsledek, který představuje řídce se vyskytující jev. V případě, že bychom jej vyloučili z další analýzy, došlo by ke ztrátě této informace. Druhý způsob spočívá v použití robustních metod (např. robustní bodové odhady polohy a rozptýlení). Ani tento případ není zcela správný, proto odlehlé hodnoty při statistickém vyhodnocování nebyly vylučovány.

Symetrie rozdělení dat byla hodnocena z parametrů šikmosti a špičatosti. Nulová šikmost znamená, že rozdělení dat je symetrické okolo průměru, kladná šikmost znamená, že rozdělení četností je zešikmeno vlevo, záporná šikmost představuje zešikmení vpravo. Špičatost je vztažena ke špičatosti normálního rozdělení, kladná špičatost znamená špičatější

rozdělení než normální a záporná špičatost, že rozdělení pozorovaných hodnot je plošší než normální.

Další statistické vyhodnocení výsledků bylo zaměřeno na sledování vlivu neovlivnitelných faktorů, jako jsou pohlaví, věk, diagnóza pacienta na naměřené výsledky. Každá skupina pacientů byla porovnána s kontrolní skupinou, do níž byli zařazeni relativně zdraví pacienti. V případě onkologických pacientů byla provedena korelace hladiny autoprotilátek proti aktivačnímu peptidu lidského prokathesinu D s hladinou nádorových markerů.

K vyhodnocení naměřených výsledků byl použit statistický program Minitab®15 Statistical Software.

### 5.3.1 Stanovení autoprotilátek proti AP pCD u zdravých pacientů (kontrolní skupina)

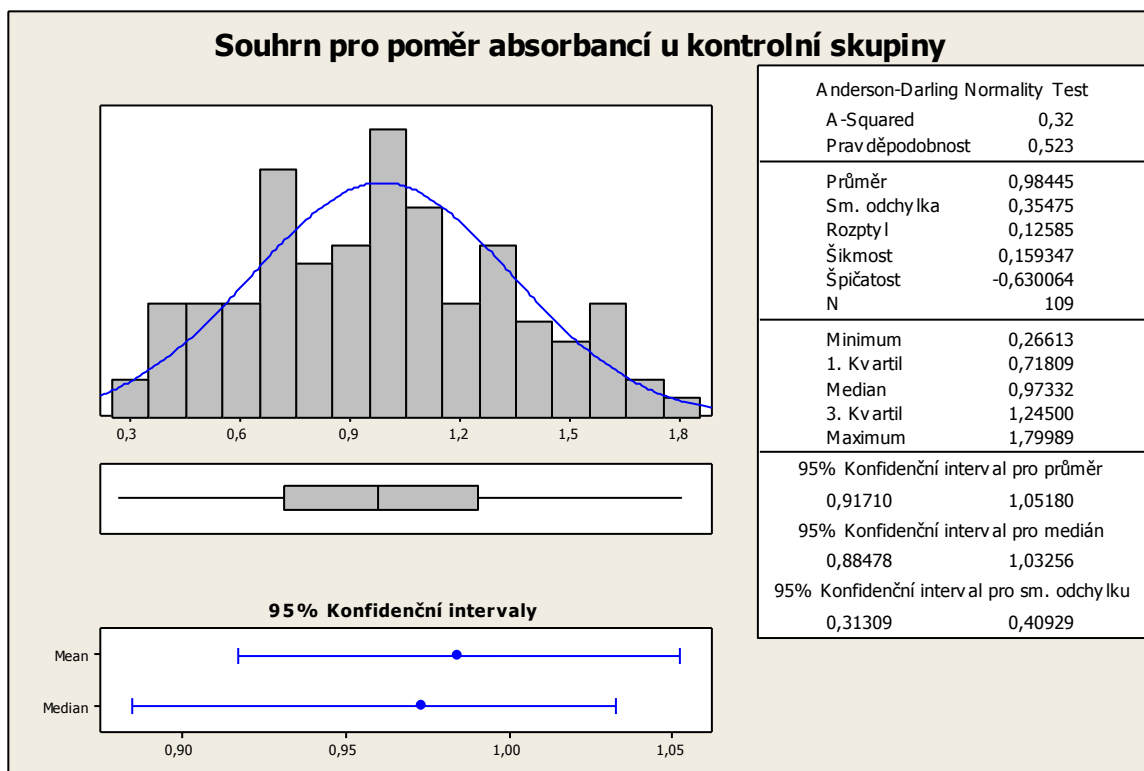
Pomocí ELISA metody jsme provedli stanovení autoprotilátek proti AP pCD v souboru (n=113) zdravých pacientů. Průměrný věk pacientů byl 43 let (25-60 let). V souboru bylo celkem 65 žen a 48 mužů. Pacienti byli rozděleni do 3 věkových kategorií 30 (20-39 let), 50 (40-59 let) a 70 (60-79 let). Souhrnné výsledky měření jsou uvedeny v následující tabulce. Pro vyšší věkovou kategorii nebyly vzorky získány.

**Tabulka 5. Souhrnné výsledky pro kontrolní skupinu.**

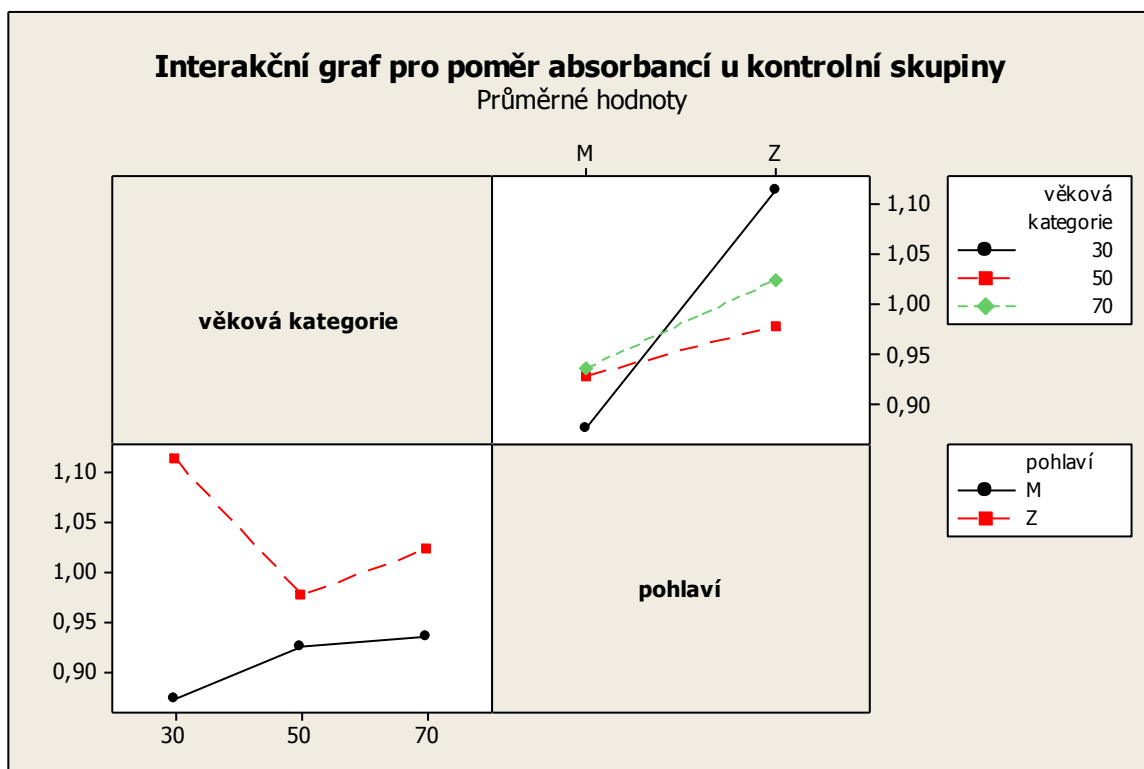
SKUPINA	POHLAVÍ	VĚK. KATEGORIE	POČET	PRŮMĚR	SMĚR. ODCHYLKA	ROZPTYL
kontrolní skupina	muži	30	21	0,8755	0,3629	0,1317
		50	17	0,9280	0,4560	0,2080
		70	10	0,9358	0,2475	0,0613
	ženy	30	29	1,1134	0,3565	0,1271
		50	29	0,9782	0,3152	0,0993
		70	7	1,0230	0,3050	0,0930

Pro kontrolní skupinu zdravých pacientů byla provedena základní popisná statistika (obr. 12.) a byl sledován vliv pohlaví a věkové kategorie na výsledek (obr. 13.-14.).

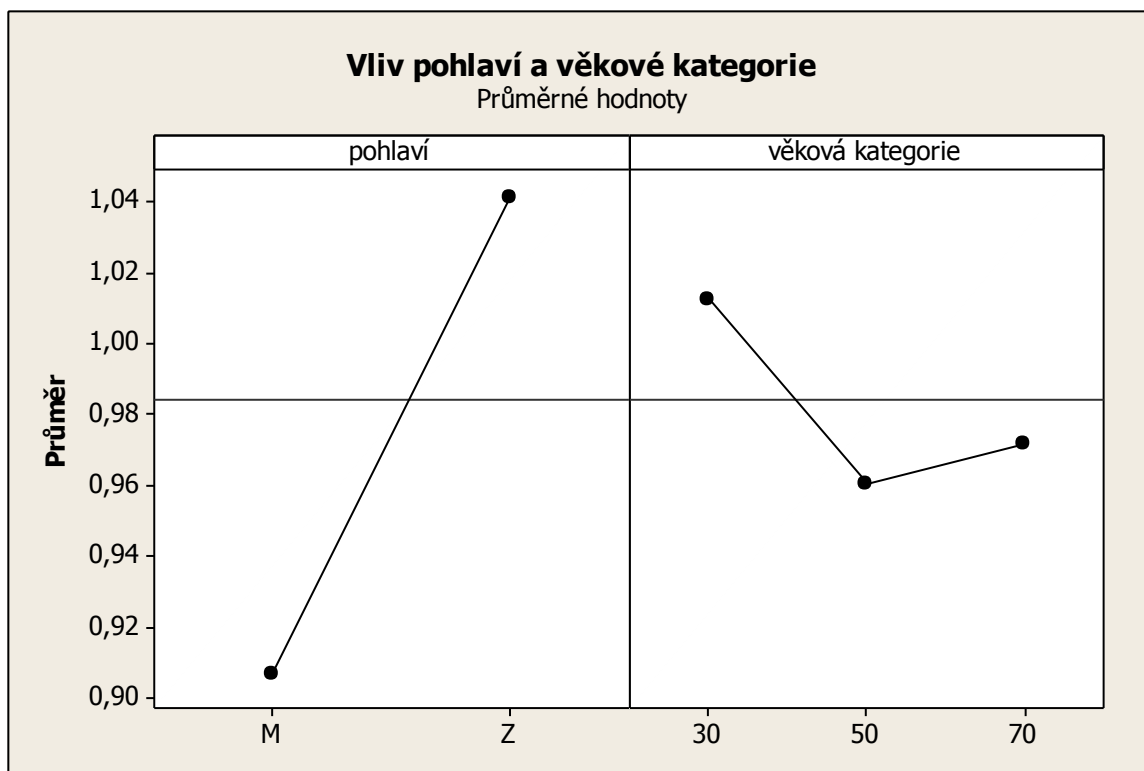




Obr. 12. Základní popisná statistika pro kontrolní skupinu.



Obr. 13. Vliv pohlaví a věkové kategorie u kontrolní skupiny.



Obr. 14. . Závislost poměru absorbancí na věku a věkové kategorii u kontrolní skupiny.

### 5.3.2 Stanovení autoprotilátek proti AP pCD u dětí

Při stanovení autoprotilátek proti AP pCD u dětí jsme provedli analýzu u skupiny zdravých dětí (n=20), kterou jsme porovnávali se skupinou nemocných dětí (n=66). V kontrolní skupině sér zdravých dětí bylo zastoupeno 12 dívek a 8 chlapců, jejichž průměrný věk byl 7 let. Skupinu nemocných dětí tvořilo 29 dívek a 37 chlapců s průměrným věkem 7 let. Pro dětská séra byly vytvořeny tři věkové kategorie 5 (1-5 let), 10 (5-10 let) a 15 (11-15 let). Výsledky měření pro obě sledované skupiny jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 6. Souhrnné výsledky pro sledované skupiny dětí.

#### a) skupina zdravých dětí

SKUPINA	POHLAVÍ	VĚK. KATEGORIE	POČET	PRŮMĚR	SMĚR. ODCHYLKA	ROZPTYL
zdravé děti	chlapci	5	4	0,5208	0,1223	0,0150
		10	2	0,5407	0,0415	0,0017
		15	2	0,4776	0,0107	0,0001
	dívkky	5	3	0,3598	0,0794	0,0063
		10	8	0,6866	0,1534	0,0235
		15	1	0,6452	0,0000	0,0000

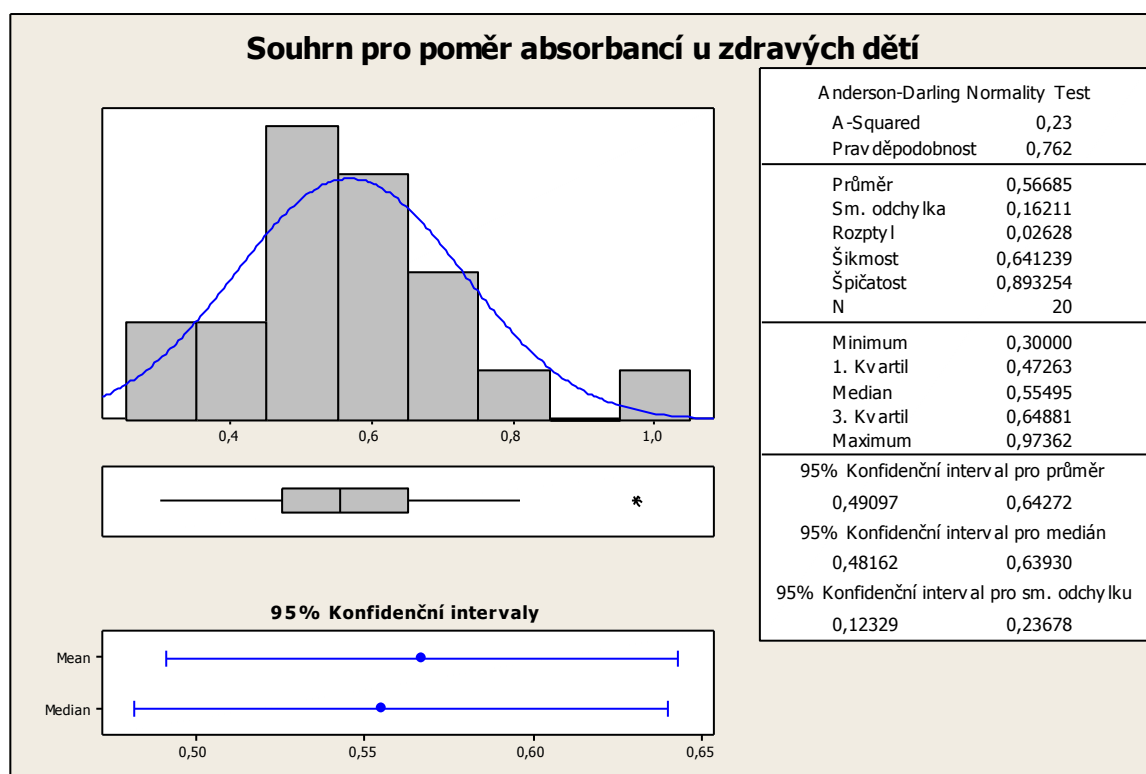
## b) skupina nemocných dětí

SKUPINA	POHLAVÍ	VĚK. KATEGORIE	POČET	PRŮMĚR	SMĚR. ODCHYLKA	ROZPTYL
nemocné děti	chlapci	5	16	0,6739	0,3944	0,1555
		10	11	0,9670	0,3600	0,1290
		15	10	0,6935	0,2300	0,0529
	dívký	5	7	0,6403	0,2209	0,0488
		10	7	0,7220	0,3050	0,0930
		15	15	0,8974	0,3230	0,1044

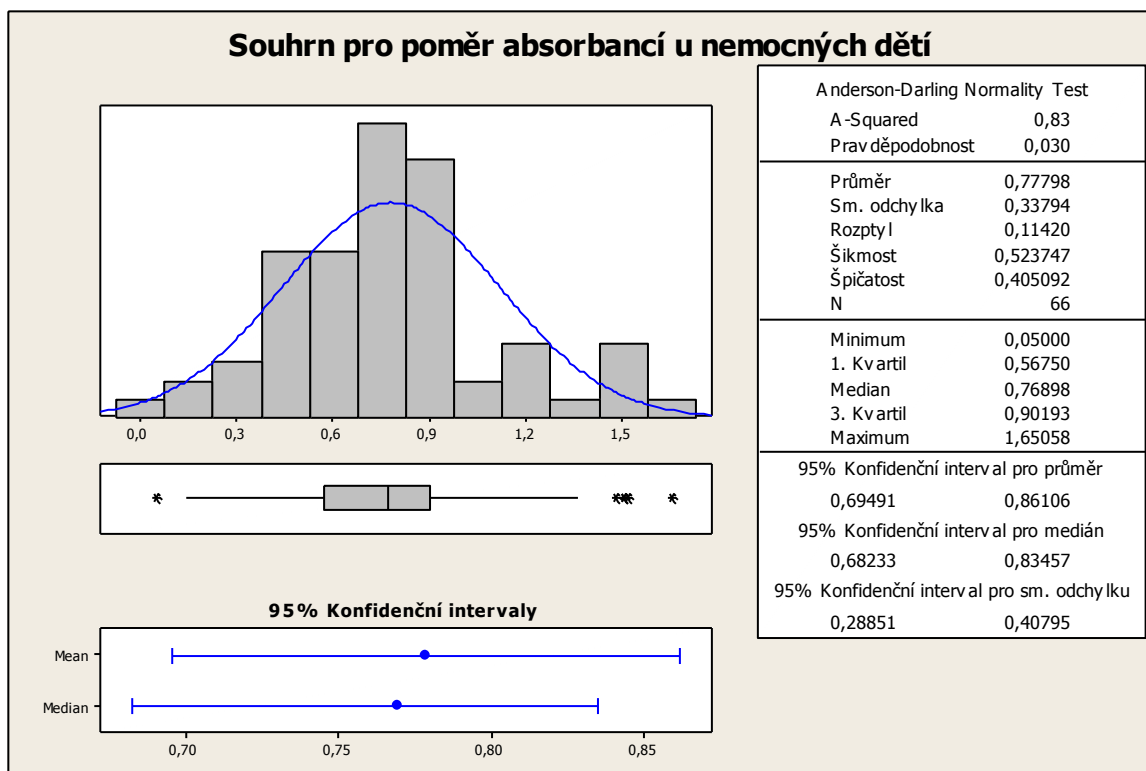
Na základě těchto výsledků byla provedena základní popisná statistika, jejíž grafické vyhodnocení je zobrazeno na následujících třech obrázcích (Obr.15-17). Je patrné, že obě skupiny mají přibližně normální rozdělení. U obou skupin jsou přítomny odlehle hodnoty, které nebyly ze statistického hodnocení vyloučeny.

Pro skupinu zdravých a nemocných dětí bylo provedeno statistické hodnocení vlivu neovlivnitelných faktorů (pohlaví, věk) na výsledky měření.

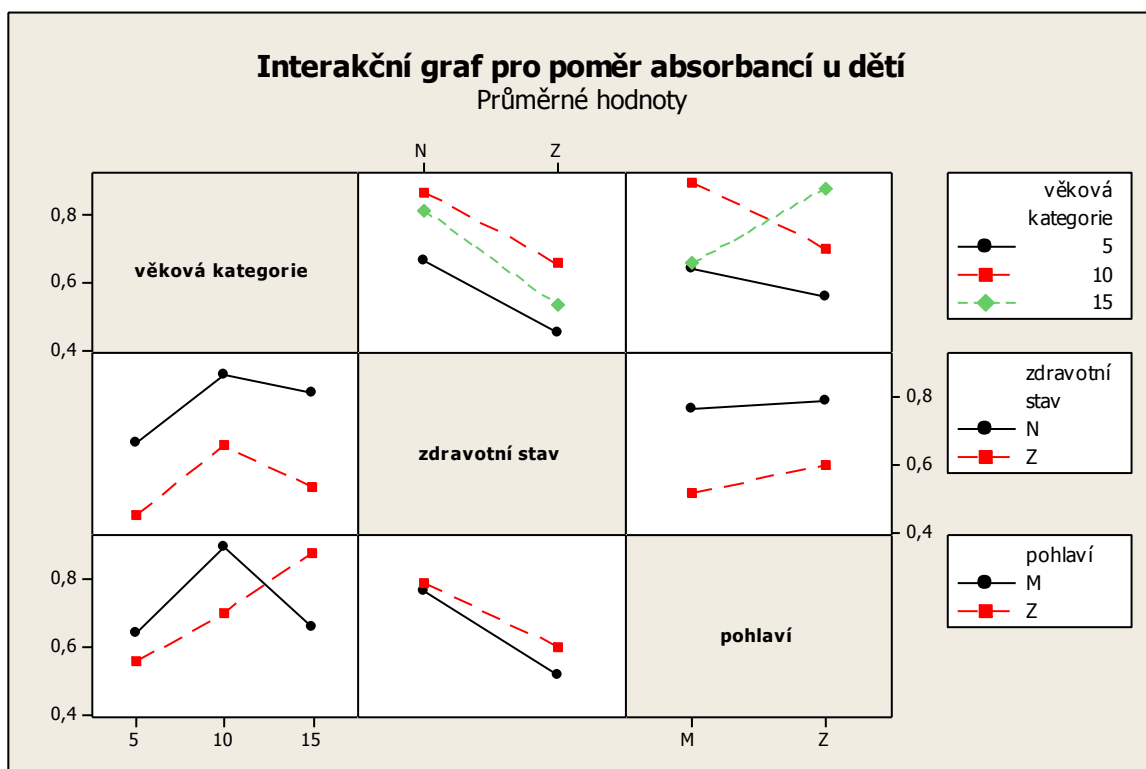
Ze základní popisné statistiky je patrné, že mezi průměrnou hodnotou pro skupinu zdravých a nemocných dětí je rozdíl. Statistická významnost tohoto rozdílu byla ověřena jednorvkovou ANOVA metodou. Pomocí této metody byla provedena analýza rozdílu mezi poměry absorbancí u skupiny zdravých a nemocných dětí. Výsledky této analýzy a grafické zobrazení rozdílu mezi skupinami jsou uvedeny dále.



Obr. 15. Základní popisná statistika pro skupinu zdravých dětí.



Obr. 16. Základní popisná statistika pro skupinu nemocných dětí.



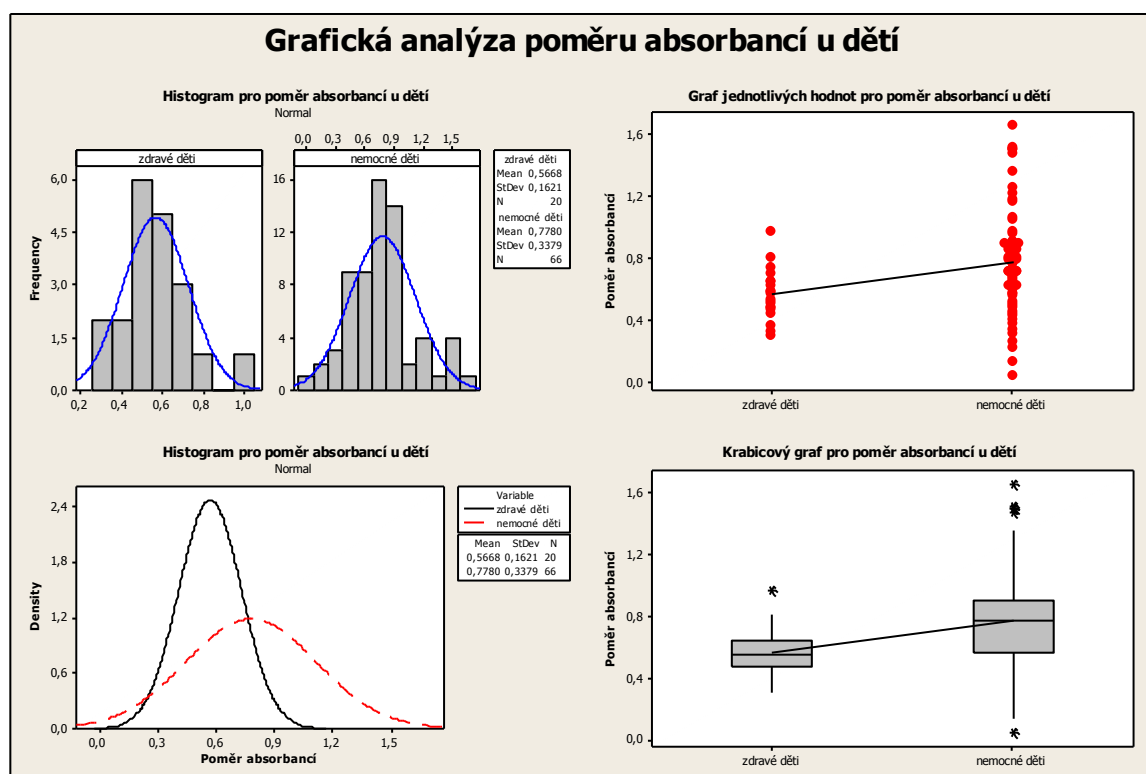
Obr. 17. Vliv pohlaví, věkové kategorie a zdravotního stavu na poměr absorbancí u dětí.

## Tabulka 7. Jednofaktorová ANOVA

Pravděpodobnost: 0,009				Konfidenční intervaly jednotlivých průměrů			
Skupina	Počet	Průměr	S	-----+-----+-----+-----+-----			
Nemocní	66	0,7780	0,3379	(-----*-----)			
Zdraví	20	0,5668	0,1621	(------*-----)			
				-----+-----+-----+-----+-----			
				0,48	0,60	0,72	0,84

Tukeyův 95% konfidenční interval pro jednotlivé průměry 95,00%

Hodnota pravděpodobnosti je v tomto případě menší než hladina významnosti ( $\alpha=0,05$ ), což potvrzuje hypotézu, že mezi skupinami je statisticky významný rozdíl. Tento rozdíl je patrný ze znázorněných konfidenčních intervalů obou skupin, jelikož nedochází k jejich překrytí. Dále byl proveden Tukeyův test, který sleduje, zda nebyla provedena chyba I. druhu. Tukeyův konfidenční interval udává pravděpodobnost, se kterou nedošlo k chybě I. druhu.



Obr. 18. Grafická analýza rozdílu poměru absorbcí u dětí.

### 5.3.3 Stanovení autoprotilátek proti AP pCD u pacientů s neonkologickým onemocněním

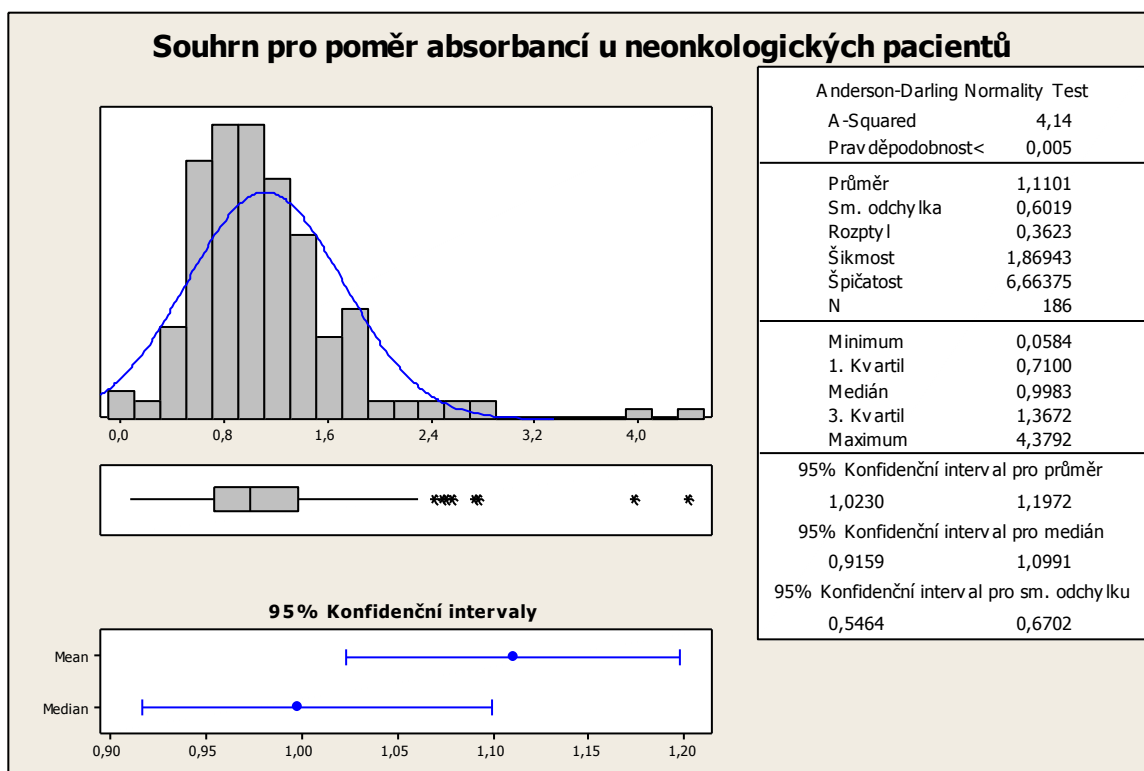
Stanovení autoprotilátek proti AP pCD jsme provedli u skupiny pacientů s neonkologickým onemocněním (n=186), kterou jsme porovnávali s kontrolní skupinou

(n=109). Průměrný věk pacientů byl 55,39 let (18-94 let). V souboru bylo celkem 117 žen a 69 mužů. Pacienti byli rozděleni do 4 věkových kategorií 30 (18-39 let), 50 (40-59 let), 70 (60 a 79 let) a 90 (80 a více let). Souhrnné výsledky měření jsou uvedeny v následující tabulce.

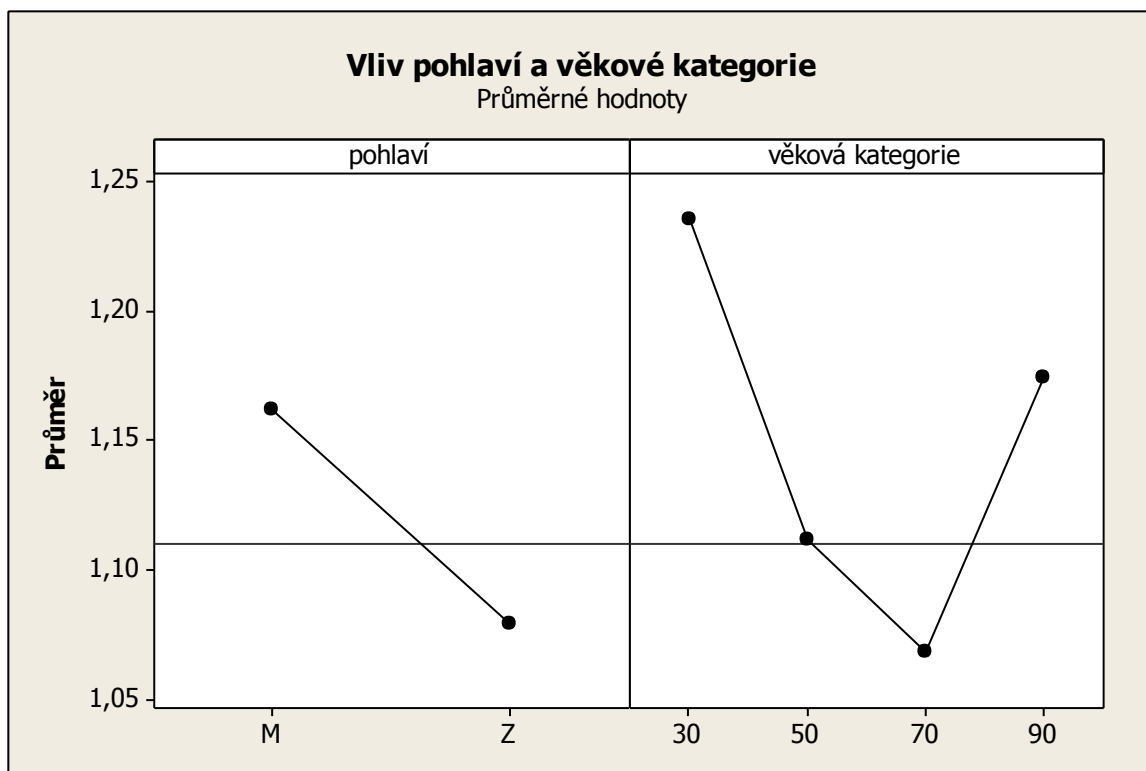
**Tabulka 8. Souhrnné výsledky pro skupinu pacientů s neoncologickým onemocněním.**

SKUPINA	POHLAVÍ	VĚK. KATEGORIE	POČET	PRŮMĚR	SMĚR. ODCHYLKA	ROZPTYL
neoncologičtí pacienti	muži	30	1	1,2900	0,0000	0,0000
		50	17	0,9800	0,5680	0,3220
		70	36	1,1155	0,4230	0,1789
		90	15	1,4720	0,8520	0,7270
	ženy	30	9	1,2290	0,6520	0,4250
		50	31	1,1840	0,6160	0,3790
		70	54	1,0369	0,6667	0,4445
		90	23	0,9797	0,4178	0,1745

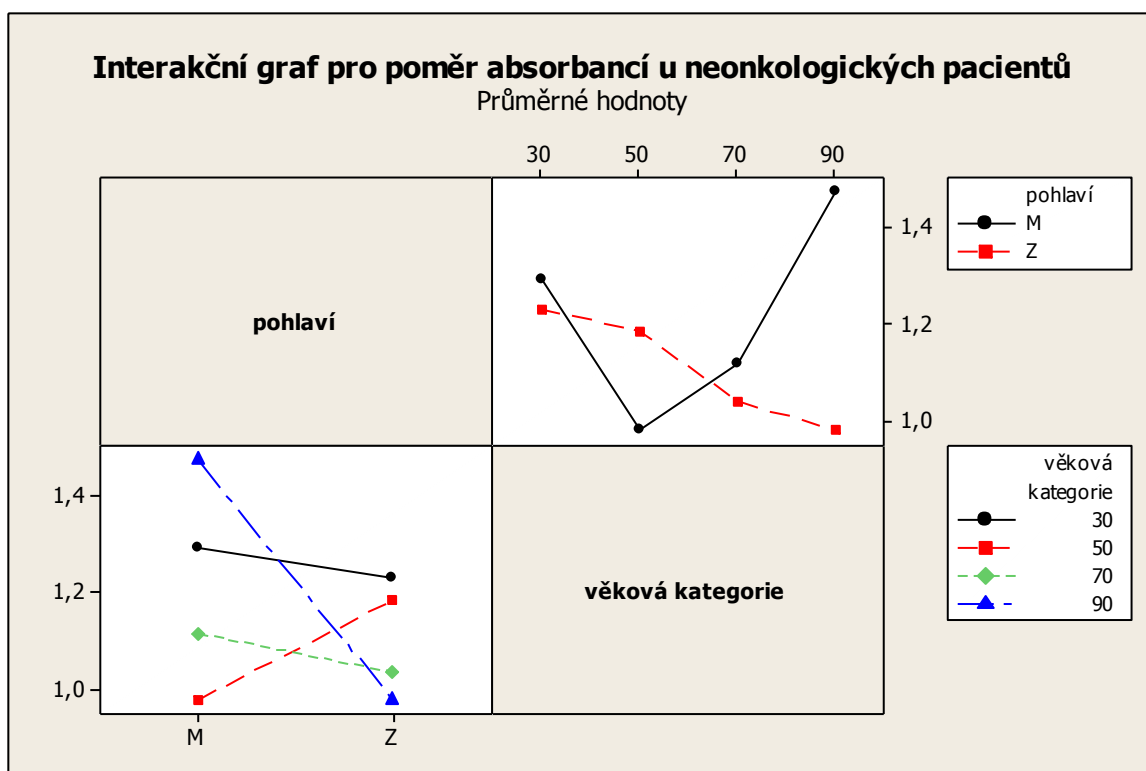
Pro skupinu neoncologických pacientů byla provedena základní popisná statistika a dále byl sledován vliv pohlaví a věkové kategorie na výsledek měření (Obr. 19-21).



**Obr.19. Základní popisná statistika pro skupinu pacientů s neoncologickým onemocněním.**



Obr. 20. Závislost poměru absorbcí na věku a věkové kategorii u skupiny neonkologických pacientů.



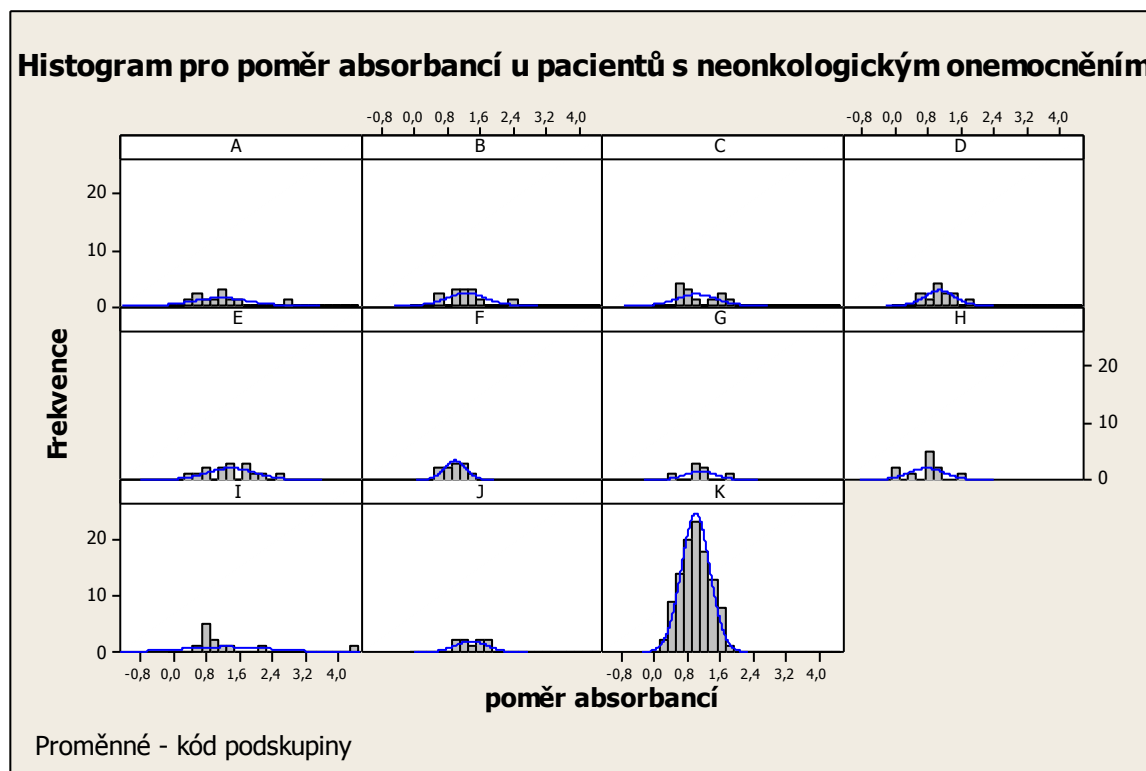
Obr. 21. Vliv pohlaví a věkové kategorie na poměr absorbcí u neonkologických pacientů.

Vzhledem k tomu, že skupina pacientů s neonkologickým onemocněním zahrnovala širokou škálu diagnóz, byly vytvořeny podskupiny podle orgánového onemocnění. V následující tabulce jsou charakterizovány jednotlivé podskupiny.

**Tabulka 9. Podskupiny neonkologických pacientů a jejich základní statistické údaje.**

KÓD PODSKUPINY	TYP ONEMOCNĚNÍ	POČET	PRŮMĚR	SMĚR.ODCHYLKA	ROZPTYL
A	onemocnění srdce	11	1,1770	0,6450	0,4160
B	ICHS	13	1,2640	0,4700	0,2210
C	onemocnění plic	12	0,9970	0,4780	0,2280
D	onemocnění jícnu a žaludku	12	1,0640	0,3550	0,1260
E	onemocnění jater	15	1,4320	0,5910	0,3490
F	onemocnění žlučníku	11	0,9929	0,2598	0,0675
G	onemocnění trávicího traktu	7	1,1060	0,3750	0,1410
H	onemocnění ledvin	11	0,7460	0,4370	0,1910
I	onemocnění hematologické	12	1,3130	1,0640	1,1320
J	onemocnění žlučových cest	9	1,3820	0,3690	0,1360
K	kontrolní skupina	109	0,9845	0,3548	0,1259

V další fázi statistického hodnocení výsledků byla sledována významnost rozdílu mezi jednotlivými podskupinami a kontrolní skupinou. Analýza byla opět provedena pomocí jednofaktorové ANOVA metody a výsledky graficky zobrazeny.



**Obr. 22. Histogramy pro jednotlivé podskupiny neonkologických pacientů.**



### Tabulka 10. Jednofaktorová ANOVA

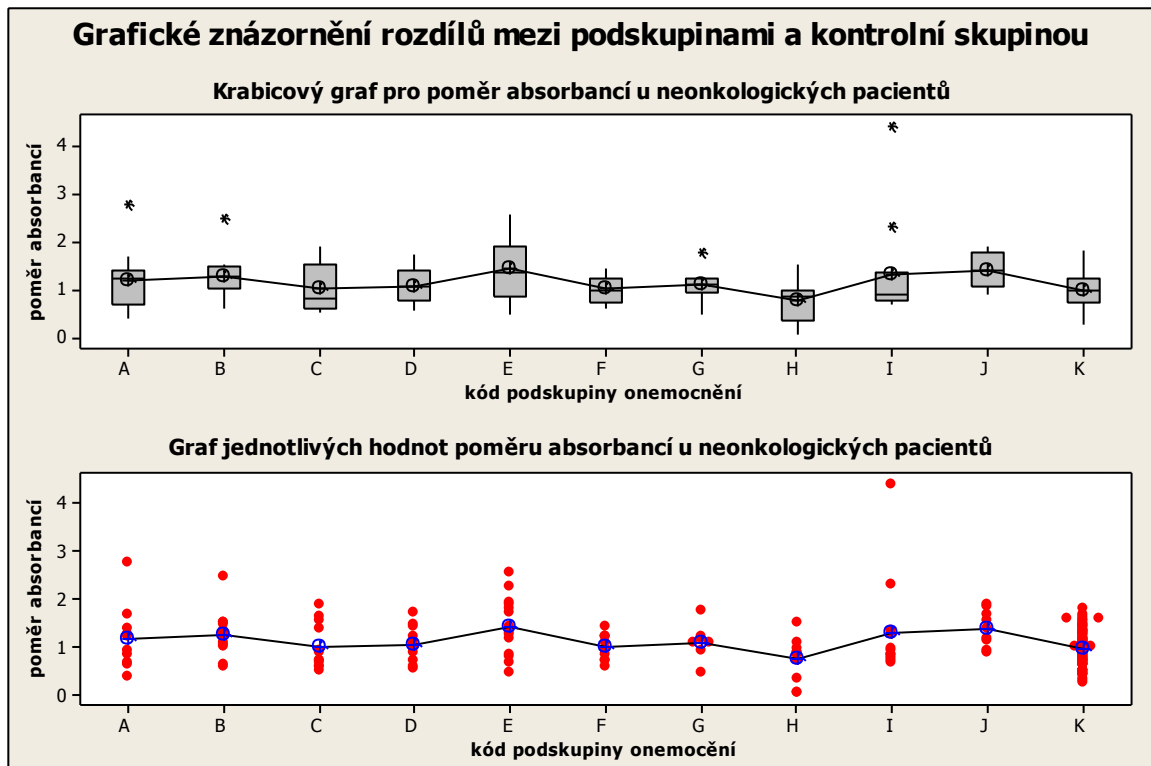
Pravděpodobnost **0,002**

Skupina	N	P	SO
A	11	1,1774	0,6447
B	13	1,2644	0,4698
C	12	0,9968	0,4778
D	12	1,0640	0,3555
E	15	1,4308	0,5909
F	11	0,9929	0,2598
G	7	1,1055	0,3748
H	11	0,7460	0,4373
I	12	1,3133	1,0639
J	9	1,3824	0,3690
K	108	0,9776	0,3492

Tukeyův 95% konfidenční interval pro jednotlivé průměry **99,87%**

Pozn. N počet vzorků, P průměr, SO směrodatná odchylka

Podskupiny, jejichž průměry se významně statisticky lišily od kontrolní skupiny, zahrnovaly onemocnění jater, žlučových cest a hematologická onemocnění a pacienti s ischemickou chorobou srdeční.



Obr. 23. Grafické znázornění rozdílu mezi podskupinami neonekologických pacientů a kontrolní skupinou.

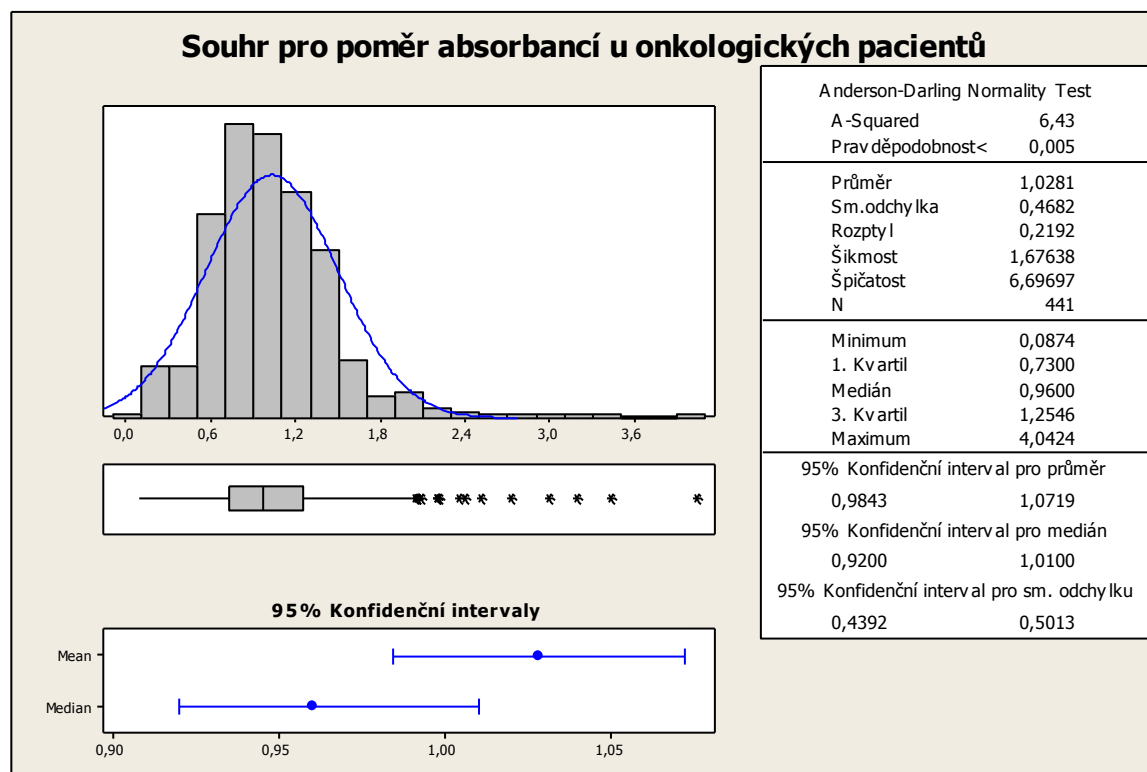
### 5.3.4 Stanovení autoprotilátek proti AP pCD u pacientů s onkologickým onemocněním

Stanovení autoprotilátek proti AP pCD jsme provedli u skupiny pacientů s onkologickým onemocněním (n=441), kterou jsme porovnávali s kontrolní skupinou (n=109). Průměrný věk pacientů byl 63,07 let (24-93 let). V souboru bylo celkem 341 žen a 100 mužů. Pacienti byli rozděleni do 4 věkových kategorií 30 (18-39 let), 50 (40-59 let), 70 (60 a 79 let) a 90 (80 a více let). Souhrnné výsledky měření jsou uvedeny v následující tabulce.

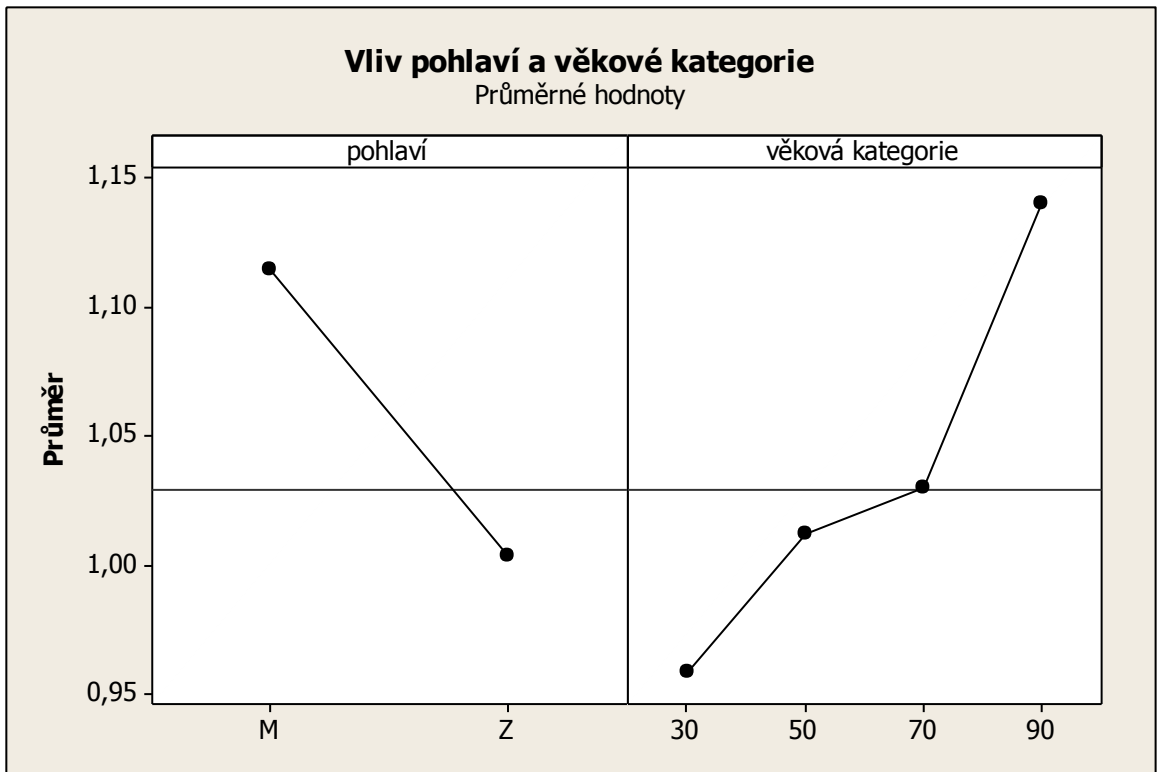
**Tabulka 11. Souhrnné výsledky pro skupinu pacientů s onkologickým onemocněním.**

SKUPINA	POHLAVÍ	VĚK. KATEGORIE	POČET	PRŮMĚR	SMĚR. ODCHYLKA	ROZPTYL
onkologičtí pacienti	muži	30	3	0,9440	0,4990	0,2490
		50	24	1,0300	0,5780	0,3340
		70	68	1,1607	0,6540	0,4277
		90	5	0,9940	0,3260	0,1060
	ženy	30	19	0,9613	0,4171	0,1740
		50	110	1,0089	0,3921	0,1537
		70	186	0,9819	0,4180	0,1748
		90	26	1,1687	0,4371	0,1911

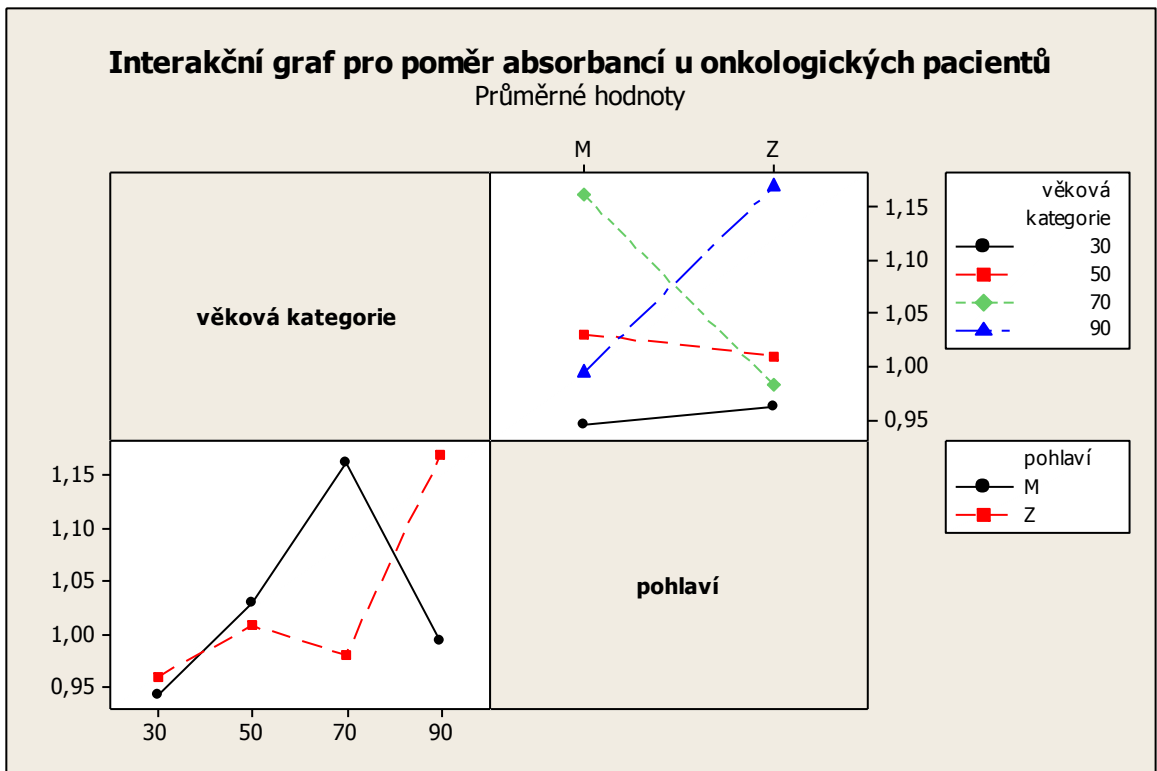
Pro skupinu pacientů s onkologickým onemocněním byla provedena základní popisná statistika a byl sledován vliv pohlaví a věkové kategorie.



**Obr. 24. Základní popisná statistika pro pacienty s onkologickým onemocněním.**



Obr. 25. Závislost poměru absorbancí na věku a věkové kategorii u skupiny onkologických pacientů.



Obr. 26. Vliv pohlaví a věkové kategorie na poměr absorbancí u onkologických pacientů.

Skupina pacientů s onkologickým onemocněním obsahovala velké množství jednotlivých diagnóz, které byly uspořádány do 24 podskupin, jejichž charakteristika je uvedena v následující tabulce. Dále byla sledována statistická významnost mezi podskupinami a kontrolní skupinou. V tabulce jsou zvýrazněna onkologická onemocnění, u nichž byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Dále pak následuje vyhodnocení jednofaktorové ANOVA metody s grafickým znázorněním získaných výsledků.

**Tabulka 12. Podskupiny onkologických pacientů a jejich základní charakteristika.**

KÓD PODSKUPINY	ONEMOCNĚNÍ	POČET	PRŮMĚR	SMĚR. ODCHYLKA	ROZPTYL
1	ZN jícen	7	0,8260	0,4940	0,2440
2	ZN žaludek	8	0,9576	0,1897	0,0360
3	ZN slepé střevo, apendix	9	0,8700	0,3860	0,1490
4	<b>ZN vzestupný tračník</b>	10	1,2410	0,2600	0,0676
5	<b>ZN příčný tračník, jaterní a slezinné ohbí</b>	10	1,2310	0,3900	0,1520
6	ZN tlusté střevo	16	1,1420	0,4170	0,1740
7	ZN rektosigmoideální spojení	6	1,0800	0,5200	0,2700
8	<b>ZN konečník</b>	26	1,1730	0,9760	0,9520
9	ZN játra	8	0,9320	0,4090	0,1670
10	<b>ZN slinivka břišní</b>	46	1,1372	0,5246	0,2752
11	ZN bronchus, průduška, plíce	11	0,8820	0,4380	0,1920
12	<b>ZN bradavka</b>	8	1,2710	0,4300	0,1850
13	<b>ZN střední část prsu</b>	7	0,7002	0,2302	0,0530
14	ZN horní vnitřní kvadrant prsu	32	1,0278	0,4138	0,1713
15	ZN dolní vnitřní kvadrant prsu	5	1,2390	0,5290	0,2790
16	ZN prs, NS	94	1,0183	0,3952	0,1562
17	ZN endocervix, exocervix	5	1,0650	0,3140	0,0980
18	<b>ZN hrdlo děložní</b>	4	1,3880	0,3790	0,1440
19	ZN tělo děložní	7	0,7820	0,5590	0,3120
20	ZN vaječník	54	0,9724	0,4031	0,1625
21	ZN bez určení lokalizace	19	1,0000	0,4400	0,1940
22	Chronická lymfocytární leukémie	4	0,8213	0,1601	0,0256
23	Leiomyom dělohy, NS	4	1,0990	0,3500	0,1220
24	Novotvar - ženský pohlavní orgán	19	0,9097	0,2315	0,0536
25	Kontrolní skupina	109	0,9844	0,3548	0,1258

Pozn. ZN zhoubný novotvar, NS blíže nespecifikováno

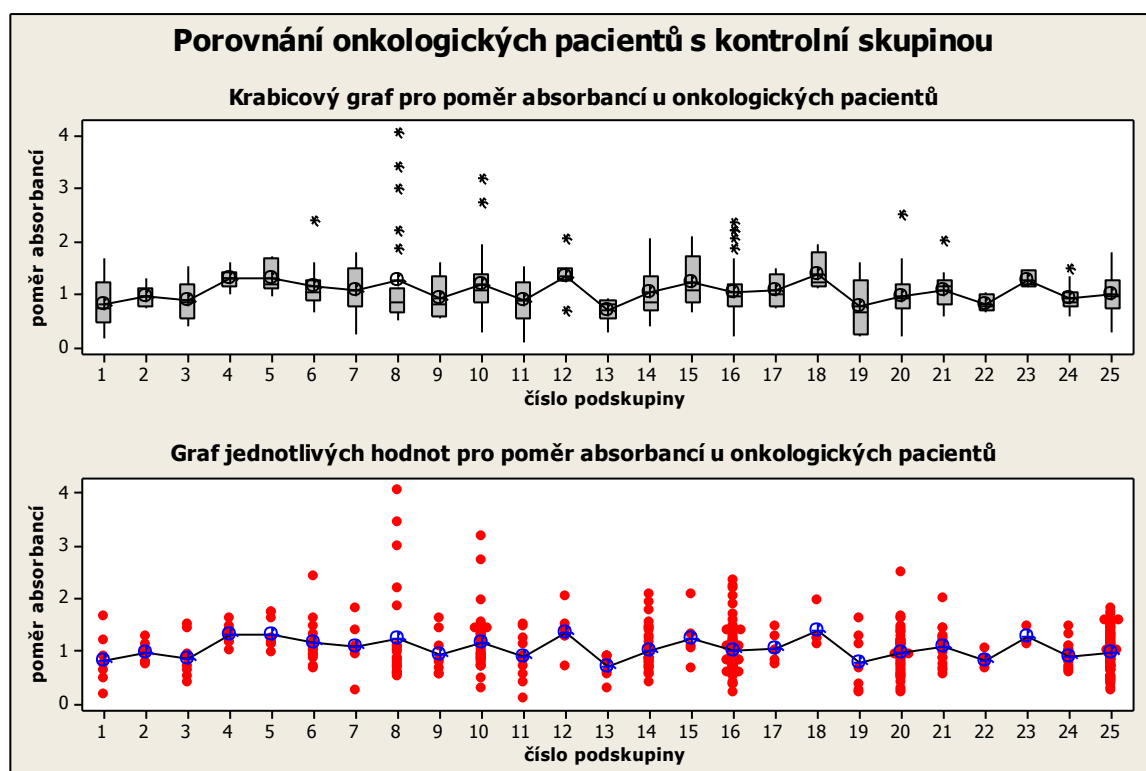
### Tabulka. 13. Jednofaktorová ANOVA

Pravděpodobnost 0,012

Skupina	N	P	SO	Konfidenční intervaly pro jednotlivé průměry
4	9	1,3031	0,1809	(-----*-----)
5	9	1,3188	0,2904	(-----*-----)
8	23	1,2462	0,9840	(---*---)
10	44	1,1725	0,5086	(--*--)
12	7	1,3502	0,3965	(-----*-----)
13	7	0,7002	0,2302	(-----*-----)
18	4	1,3876	0,3791	(-----*-----)
25	109	0,9844	0,3548	(-*-)

Tukeyův 95% konfidenční interval pro jednotlivé průměry 99,97%

Pozn. N počet, P průměr, SO směrodatná odchylka



Obr. 27. Porovnání poměru absorbancí podskupin onkologických onemocnění.

Pozn. Kontrolní skupina je označena číslem 25.

U podskupin, jejichž průměry absorbancí se významně lišily od průměru absorbance kontrolní skupiny, byla provedena korelace s vybraným nádorovým markerem. V případě zhoubných novotvarů konečnicku, vzestupného a příčného tračnicku, jaterního a slezinného ohbí byl zvolen CEA a pro zhoubný novotvar slinivky břišní CA 19-9. Pro zhoubné novotvary bradavky a střední části prsu byl použit CA 15-3. CEA, CA 19-9 a CA 15-3 jsou hlavními nádorovými markery pro diagnostiku těchto nádorových onemocnění.

**Tabulka 14. Korelace nádorového onemocnění s nádorovým markerem.**

<b>Korelace nádorového onemocnění s nádorovým markerem</b>			
<b>Nádorové onemocnění</b>	<b>Nádorový marker</b>	<b>Pearsonův korelační koeficient</b>	<b>Pravděpodobnost</b>
ZN bradavka	CA 15-3	0,659	0,076
ZN střední část prsu	CA 15-3	0,285	0,536
ZN vzestupný tračník	CEA	-0,642	0,045
ZN příčný tračník, jaterní a slezinné ohbí	CEA	-0,039	0,927
ZN konečník	CEA	0,350	0,094
ZN slinivka břišní	CA 19-9	-0,126	0,406

Z tabulky vyplývá, že hladina autoprotilátek proti aktivačnímu peptidu prokathepsinu D u uvedených onemocnění nekoreluje s hladinou nádorového markeru. Pokud je Pearsonův korelační koeficient kladný a blíží-li se k 1, znamená to, že mezi faktory je lineární závislost. Dále musí být splněna podmínka, že pravděpodobnost musí být nižší než hladina významnosti. Obě tyto podmínky nebyly splněny ani u jednoho z páru faktorů.

## 6 DISKUZE

### Optimalizace metody

Imunoanalytické metody jsou v současné době velmi používány pro svou specifitu a senzitivitu. Z tohoto důvodu byla pro stanovení autoprotilátek proti AP pCD zvolena metoda ELISA. Existuje již řada ELISA metod na stanovení molekuly pCD nebo CD, ale dosud nebyl vytvořen postup na stanovení autoprotilátek proti AP pCD. Bylo proto nutné zvolit vhodné podmínky a provést optimalizaci metody. Při statistickém vyhodnocení pomocí párového t-testu (Tabulka 3.,4.) bylo zjištěno, že mezi výsledky získanými opakovaným měřením není statisticky významný rozdíl a tyto výsledky splňují požadovanou přesnost sledovanou v čase i sérii. Určení správnosti metody nebylo možno provést, protože jsme neměli k dispozici vzorek s přesně známou koncentrací těchto autoprotilátek. V další části výzkumu bychom se chtěli zaměřit na izolaci těchto protilátek ze sér pacientů např. pomocí afinitní chromatografie a na základě toho stanovit přesnou koncentraci.

### Hladina autoprotilátek proti AP pCD u dětí

Děti jsou po stránce biochemické a metabolické unikátní skupina, nejedná se o miniaturu dospělých. Při hodnocení naměřených výsledků je důležité znát věk dítě, protože bez této informace nelze správně hodnotit výsledky. U novorozenců je hladina protilátek třídy IgG na stejné úrovni jako u dospělých osob (1-16 g/l). Je to způsobeno tím, že IgG matky jsou schopny procházet placentou a zajišťují tak ochranu novorozenci. Tři měsíce po porodu dochází k poklesu koncentrace IgG na poloviční hodnotu, což je vysvětleno poločasem životnosti matčinych protilátek.

Hladina autoprotilátek proti AP pCD u zdravých dětí byla v porovnání se skupinou nemocných dětí nižší, jak je patrné z Obr. 18. Pomocí jednofaktorové ANOVA metody (Tabulka 7.) bylo zjištěno, že mezi těmito dvěma skupinami je statisticky významný rozdíl. Hladina autoprotilátek proti AP pCD se nachází v intervalu hodnot od 0,48 – 0,84. Zajímavé je, že hodnota 0,72 rozděluje tento interval na dvě části: hodnoty do 0,72 byly naměřeny pro zdravé a naopak vyšší hodnoty pro nemocné děti. Dá se říci, že tato hodnota představuje hraniční hodnotu mezi skupinou zdravých a nemocných dětí.

Při sledování vlivu pohlaví a věkové kategorie byla hladina autoprotilátek těmito faktory ovlivněna. Z interakčního grafu (Obr. 17.) pro nemocné děti je patrné několik jevů. Nejvyšší hladina autoprotilátek byla naměřena u dětí ve věku 5-10 let. Pro děti ve věku 1-5 let

byla naopak naměřena nejnižší koncentrace autoprotilátek. Hladina autoprotilátek byla také ovlivněna pohlavím, přičemž o něco vyšší hodnoty byly naměřeny u dívek.

Žádný pacient ze skupiny nemocných dětí neměl v diagnóze nádorové onemocnění. S ohledem na naměřené hladiny autoprotilátek je možné se domnívat, že imunitní systém pacienta byl vystaven antigenu aktivačního peptidu pCD exprimovanému normálními buňkami za jiných než nádorových podmínek např. při zánětlivém onemocnění.

### **Hladina autoprotilátek proti AP pCD u kontrolní skupiny pacientů**

Statistické vyhodnocení výsledků měření hladiny autoprotilátek proti AP pCD u kontrolní skupiny pacientů ukázalo, že rozdělení hodnot v této skupině odpovídá normálnímu rozdělení. Průměrná hodnota autoprotilátek byla v této skupině pacientů 0,98. Hladina autoprotilátek byla ovlivněna faktory pohlaví a věkové kategorie. Vyšší průměrné hodnoty se objevují u žen ve věkové kategorii 30, zatímco u mužů byl zjištěn mírný růst s rostoucí věkovou kategorií (Obr. 13.). Jak je patrné z Obr. 14., nejnižší průměrnou hodnotu autoprotilátek v séru mají pacienti kontrolní skupiny ve věku 40-59 let.

### **Hladina autoprotilátek proti AP pCD u pacientů s neonkologickým onemocněním**

V sérech pacientů s jiným než onkologickým onemocněním byla měřena hladina autoprotilátek proti AP pCD třídy IgG stejně jako u ostatních sledovaných skupin.

Průměrná hodnota hladiny autoprotilátek byla 1,11, což je v porovnání s kontrolní skupinou vyšší hodnota, ale vzhledem k tomu, že intervaly hodnot pro skupiny pacientů s neonkologickým onemocněním a kontrolní skupinu se překrývají, nelze jednoznačně říci, že mezi skupinami jako celky je statisticky významný rozdíl. Proto bylo provedeno porovnání kontrolní skupiny s podskupinami pacientů s neonkologickým onemocněním. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn u pacientů s ischemickou chorobou srdeční, onemocněním jater, žlučových cest a u pacientů s hematologickým onemocnění (Tabulka 10.). Právě u těchto podskupin onemocnění byly také naměřeny nejvyšší průměrné hodnoty autoprotilátek proti AP pCD v intervalu 1,26 – 1,43, (Tabulka 9.).

Na koncentraci autoprotilátek měl vliv věk a pohlaví pacienta. Z interakční grafu (Obr. 21.) je patrné, že u mužů pro věkové kategorie 30, 70 a 90 byly naměřeny výrazně vyšší hladiny autoprotilátek než u žen. U žen se zvyšujícím se věkem je patrný pokles hladiny autoprotilátek v séru.



### **Hladina autoprotilátek proti AP pCD u pacientů s onkologickým onemocněním**

U pacientů s onkologickým onemocněním často dochází k rozvoji protinádorové imunitní odpovědi proti exprimovaným nádorovým antigenům. Imunoglobuliny proti nádorovým antigenům a cirkulující antigeny jsou uvolňovány dříve, než dojde k rozvoji patrného nádoru nebo před klinickou manifestací remise onemocnění. Na nádorové onemocnění se v současné době nazírá jako na akumulaci genetických poruch v genomu buňky a jeho vznik závisí na mnoha faktorech. Je nepochybné, že v těle člověka dochází v průběhu života k mnoha situacím, které ho vystavují riziku nádorového bujení. Imunitní systém člověka je schopen tyto situace řešit. Většina případů nádorových onemocnění se vyskytuje u starších osob, což může být vysvětleno sníženou funkcí imunitního systému a tím dochází k omezení protinádorové imunity.

Při stanovení autoprotilátek proti AP pCD v séru pacientů s onkologickým onemocněním byla zjištěna vyšší hladina u mužů než u žen. Nejvyšší průměrné hodnoty u mužů byly naměřeny u věkové kategorie 70 a u žen ve věkové kategorii 90 (Tabulka 11.). Nejnižší hodnoty autoprotilátek byly naměřeny pro obě pohlaví ve věkové kategorii 30. Je patrné, že se vzrůstajícím věkem dochází k růstu hladiny autoprotilátek v séru pacientů (Obr. 25.).

Při srovnání jednotlivých podskupin pacientů s nádorovým onemocněním s kontrolní skupinou byl zjištěn statisticky významný rozdíl u pacientů se zhoubným nádorem konečníku, vzestupného a příčného tračnicku, jaterního a slezinného ohbí a slinivky břišní. Dále byla hladina autoprotilátek výrazně vyšší u pacientek se zhoubným nádorem bradavky a děložního hrdla.

Je zajímavé, že u pacientek se zhoubným nádorem střední části prsu byla naměřena hladina autoprotilátek proti AP pCD výrazně nižší než u kontrolní skupiny pacientů a již zmíněných nádorových onemocnění.

U výše zmíněných zhoubných nádorů byla provedena korelace s koncentrací nádorového markeru. Pro zhoubný nádor bradavky a střední části prsu byl zvolen CA 15-3, který je citlivým nádorovým markerem u tohoto onemocnění. U zhoubného nádoru vzestupného a příčného tračnicku, jaterního a slezinného ohbí a konečníku byla provedena korelace s CEA, který představuje hlavní nádorový marker těchto onemocnění. Pro zhoubný nádor slinivky břišní byl zvolen nádorový marker CA 19-9. Výsledek provedené korelace neposkytl pozitivní výsledek. Hladina autoprotilátek u těchto onemocnění tedy nekoreluje s hladinou CEA, CA 15-3 a CA 19-9.

## 7 ZÁVĚR

Závěrem je možné konstatovat, že se nám podařilo vypracovat a optimalizovat metodu na stanovení autoprotilátek proti aktivačnímu peptidu prokathepsinu D, pomocí níž byly vyšetřeny skupiny pacientů zahrnující děti, osoby s jiným než onkologickým onemocněním a osoby s onkologickým onemocněním. Následně byla provedena statistická analýza získaných vzorků, která nám poskytla informace o korelaci hladiny autoprotilátek se zdravotním stavem pacienta a že tato hladina je ovlivňována faktory pohlaví a věkové kategorie.

V této fázi výzkumu není možné použít hladinu autoprotilátek proti AP pCD jako tumorového markeru. V důsledku nedostatku informací o stádiu nemoci, terapii a jejím účinku nebylo možno provést korelaci. Nicméně výsledky naznačují slibné směry a ukazují, že je racionální ve výzkumu pokračovat.

## 8 LITERATURA

1. Kroulíková M., Fusek M., Ruml T.: Kathepsin D a jeho vztah k onkogenezi. *Chem. Listy* 97:192-199, 2003.
2. Metcalf P., Fusek M.: Two crystal structures for cathepsin D: The lysosomal targeting signal and active site. *EMBO J.* 12:1293-1302, 1993.
3. Fusek M., Větvička V.: Dual role of cathepsin D: ligand and peptidase. *Biomed. Papers* 149(1):43-50, 2005.
4. Xunxiang Z., Conner E.G.: Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269:3846, 1994.
5. Fortenberry S.C., Schorey J.S. and Chirgwin J.M.: Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. *J. Cell. Sci.* 108:2001-2006, 1995.
6. Větvička V., Beneš P., Fusek M.: Procathepsin D in breast cancer: What do we know? Effect of ribozymes and other inhibitors. *Cancer Gene Ther.* 9:854-863, 2002.
7. Dahms N. M., Lobel P. and Kornfeld S.: Mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem*, 264, No.21, 12115-12118, 1989.
8. Laurent-Matha V., Lucas A., Huttler S., Sandhoff K., Garcia M., Rochefort H.: Procathepsin D interacts with prosaposin in cancer cells but its internalization is not mediated by LDL receptor-related protein. *Exp. Cell Res.* 277:210-219, 2002.
9. Capony F., Braulke T., Rougeot C., Roux S., Montcourrier P., Rochefort H.: Specific mannose-6-phosphate receptor-independent sorting of procathepsin D in breast cancer cells. *Exp Cell Res* 215:154-63, 1994.
10. Liaudet-Coopman E., Beaujouin M., Derocq D., Garcia M., Glondu-Lassis M., Laurent-Matha V., Prébois Ch., Rochefort H., Vignon F.: Cathepsin D: newly discovered functions of long-standing aspartic peptidase in cancer and apoptosis. *Cancer Lett.* 237:167-179, 2006.
11. Garcia M., Platet N., Liaudet E., Laurent V., Derocq D., Brouillet J.P., Rochefort H.: Biological and Clinical significance of Cathepsin D in Breast Cancer Metastasis. *Stem Cells* 14:642-650, 1996.
12. Větvička V., Větvičková J., Fusek M.: Anti-human procathepsin D activation peptide antibodies inhibit breast cancer development. *Breast. Cancer. Res. and Treat.* 57:261-269, 1999.
13. Cavallès V., Augereau P., Rochefort H.: Cathepsin D gene is controlled by mixed promotor, and estrogens stimulates only TATA-dependent transcription in breast cancer cells. *Biochemistry* 90:203-207, 1993.
14. Capony F., Rougeot C., Montcourrier P., Cavailles V., Salazar G., and Rochefort H.: Increased secretion, altered processing, and glycosylation of procathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res.* 49:3904-3909, 1989.
15. Fusek M., Větvička V.: Mitogenic function of human procathepsin D: the role of the propeptid. *Biochem. J.* 303:775-780, 1994.
16. Větvička V., Větvičková J., Beneš P.: Role of enzymatically inactive procathepsin D in lung cancer. *Anticancer Res.* 24:2739-2743, 2004.
17. Rochefort H., Garcia M., Glondu M., Laurent V., Liaudet E., Rey J.-M., Roger P.: Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clinica Chimica Acta* 291:157-170, 2000.
18. Glondu M., Coopman P., Laurent-Matha V., Garcia M., Rochefort H., Liaudet-Coopman E.: A mutated cathepsin D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene* 20:6920-6929, 2001.

19. Fusek M., Větvičková J. and Větvička V.: Secretion of Cytokines in Breast Cancer Cells: The Molecular Mechanism of Procathepsin D Proliferative Effects. *J. Interferon Cytokine Res.* (v tisku)
20. Větvička V., Větvičková J., Hilgert I., Voburka Z., Fusek M.: Analysis of the interaction of procathepsin D activation peptide with breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 73: (3) 403-409, 1997.
21. Kute T.E. et al.: Cathepsin D as a prognostic indicator for node-negative breast cancer patients using both immunoassays and enzymatic assay. *Cancer Research* 52:5198-5203,1992.
22. Leto G. et al.: Cathepsin D expression levels in nongynecological solid tumors: clinical and therapeutic implications. *Clin. Exp. Metastase* 21:91-106,2004.
23. Ohri S.S., Fusek M., and Větvička V.: Cathepsin D and procathepsin D-are they two different proteins? *Res. Adv. In Cancer*, 4:53-63,2004.
24. Brouillet J.-P., Divour F., Lemamy G., Garcia M., Schlup N., Grenier J., Mani J.-C., and Rochefort H.: Increased cathepsin D level in the serum of patients with metastatic breast carcinoma detected with a specific pro-cathepsin D immunoassay. *Cancer* 79:2132-2136,1997.
25. Taliemi M. et al.: Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Cancer Letters* 205:97-106,2004.
26. Shaheen R.M., Miseljc S., Wiehle R.D., and Wittliff J.L.: Relation between cathepsin D expression and other prognostic factors in breast carcinomas. *Clin. Chem.* 41/11:1585-1591, 1995.
27. Garcia M., Capony F., Derocq D., Simon D., Pau B., and Rochefort H.: Charakterization of monoclonal antibodies to the estrogen-regulated M<sub>r</sub> 52,000 glycoprotein and their use in MCF7 cells. *Cancer Research* 45:709-716,1985.
28. Duffy M.J., Brouillet J.-P., Reilly D., McDermott E., O'Higgins N., Fennelly J.J., Maudelonde T., and Rochefort H.: Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: Correlation with biochemical, histological, and clinical findings. *Clin. Chem.* 37/1:101-104, 1991.
29. Vukasavjevic D.N. et al.: Immunoradiometric assay of Cathepsin D: Estrogen-regulated vs. nonestrogen-regulated cathepsin D expression in relation to clinicopathological features of breast cancer. *Archive of Oncology*. 10(3):115-117, 2002.
30. Yamada T., Hara S., and Tamai M.: Immunohistochemical localization of cathepsin D in ocular tissues. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31:1217-1223, 1990.
31. Würfl P., Taubert H., Meye A. et al.: Immunohistochemical and clinical evaluation of cathepsin expression in soft tissue sarcomas. *Virchows Arch.* 430:221-225, 1997.
32. Veneroni S. et al.: Quantitative immunohistochemical determination of cathepsin D and its relation with other variables. *Breast Cancer Research and Treatment* 26:7-13, 1993.
33. Couissi D., Dubios V., Remacle C., Schonne E., and Trouet A.: Western immunoblotting and enzymatic activity analysis of cathepsin D in human breast cancer cell lines of different invasive potential. Regulation by 17 $\beta$ -estradiol,tamoxifen and ICI 182,780. *Clin. Exp. Metastasis* 15:349-360, 1997.
34. Riley L.B. et al.: Analysis of cathepsin D in human breast cancer: Usefulness of the processed 31 kDa aktive form of the enzyme as a prognostic indicator in node-negative and node-positive patients. *Breast Cancer Research and Treatment*. 60:173-179, 2000.

35. Beneš P., Koelsch G., Dvořák B., Fusek M., and Větvička V.: Detection of procathepsin D in rat milk. *Komparative biochemistry and physiology part B*. 133:113-118, 2002.
36. Conner G.E.: Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography. *Biochem. J.* 263:601-604, 1989.
37. Wittlin S., Rosel J., and Stover D.R.: One-step purification of cathepsin D by affinity chromatography using immobilized propeptid sequences. *Eur. J. Biochem.* 252:530-536, 1998.
38. Freiss G., Vignon F., Pau B., Paolucci F., and Rochefort H.: A two-site immunoenzymometric assay of 52-kDa procathepsin D, and its use in human breast cancer diseases. *Clin. Chem.* 35/2:234-237, 1989.
39. Maudelonde T., Khalaf S., Garcia M., et al.: Immunoenzymatic Assay of M<sub>r</sub> 52,000 cathepsin D in 182 breast cancer cytosolu: low correlation with other prognostic parameters. *Cancer Research* 48:462-466, 1989.
40. Pujol P. et al.: A prospective study of the prognostic value of cathepsin D levels in breast cancer cytosolu. *Cancer* 71:2006-2012, 1993.
41. Thorpe S.M., Rochefort H., Garcia M., et al.: Association between high concentration of M<sub>r</sub> 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Research* 49:6008-6014, 1989.
42. Suzumori N., Ozaki Y., Ogasawara M., and Suzumori K.: Increased concentration of cathepsin D in peritoneal fluid from women with endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, 7:459-462, 2001.
43. Fakuda M.E. et al.: Cathepsin D is a potential serum marker for poor prognosis in glioma patients. *Cancer Res.* 65(12):5190-5194, 2005.
44. Bosscher J.R. et al.: Epitope recognition by anti-cathepsin D autoantibodies in endometrial cancer patients. *Gynecologic Oncology*, 81:138-143, 2001.
45. Chinni S.R., Taylor C.G., Conner G.E., and Taylor D.D.: Cathepsin D antigenic epitopes identified by the humoral response of the ovaria cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 46:48-54, 1998.
46. Chinni S.R. et al.: Humoral immune response to cathepsin D and glucose-regulated protein 78 in ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 3:1557-1564, 1997.
47. Nádorové markery a jejich stanovení, *Immunotech*, 2004.
48. Eckschlanger T., Průša T.: *Laboratorní vyšetření v onkologii*. Triton, 75-126, 2002.
49. Adam Z., Vorlíček J. a spolupracovníci: *Obecná onkologie*, Masarykova univerzita v Brně, 2004.
50. Racek J.: *Klinická biochemie*, 231-241, Galén, 2006.
51. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: *Novotvary 2004*
52. Nádorové markery a klinická praxe, *Lékařské listy* 34, 2004.
53. Technical Guide for ELISA – [www.kpl.com](http://www.kpl.com)
54. Maňčal P.: *Metody enzymové imunoanalýzy*. RUCH Liberec, 1987.
55. Wu J.T.: *Quantitative immunoassay: A Practical Guide for Assay Establishment, Troubleshooting and Clinical Application*. American Association for Clinical Chemistry, 2000.
56. Glondou M., Coopman P., Laurent-Matha V., Garcia M., Rochefort H., Liaudet-Coopman E.: A mutated cathepsin D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene* 20:6920-6929, 2001.