

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



Ing. Lenka Hanousková

Využití imunochemických metod v diagnostice
nádorových a degenerativních onemocnění

The use of immunochemical methods in the diagnostic of cancer
and degenerative disease

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. Ing. Karel Kotaška PhD

Praha, 2021

Autor práce: Lenka Hanousková

Vedoucí práce: doc. Ing. Karel Kotaška Ph.D.

Datum obhajoby: 2021

Identifikační záznam:

HANOUSKOVÁ, Lenka. *Využití imunochemických metod v diagnostice nádorových a degenerativních onemocnění. [The use of immunochemical methods in the diagnostic of cancer and degenerative disease]*. Praha, 2021, počet stran: 103. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2.LF a FNM. doc. Ing. Karel Kotaška Ph.D.

Abstrakt

Úvod: Imunochemické metody jsou důležitým pomocníkem klinických lékařů i odborníků v biomedicínském výzkumu. Předností imunochemických metod je jejich vysoká citlivost a přesnost. Cílem práce bylo využít imunochemických metod ke stanovení biomarkerů nádorových a degenerativních onemocnění. Byly provedeny celkem čtyři studie. Dvě studie se zabývaly hledáním nových biomarkerů karcinomu prostaty, třetí studie se zabývala sledováním FGF23 u pacientů s hyperparathyreózou a čtvrtá studie se zabývala stanovením kyseliny hyaluronové u pacientů s gonartrózou kolene.

Metody a pacienti: 1. studie: Koncentrace Chromograninu A, Endoglinu, TIMP-1 a thymidinkinázy 1 (TK1) v séru a Endoglinu, SPINK-1, Annexinu, TIMP-1 v moči byly měřeny u 58 pacientů (průměrného věku 68 let, rozmezí 45 – 82 let) s klinicky diagnostikovaným karcinomem prostaty a 30 zdravých jedinců (průměrného věku 64 let, rozmezí 55 – 78 let) bez relevantní urologické anamnézy a hodnoty PSA v normě. TK1 byla vybrána jako nejvhodnější marker a sérové koncentrace TK1 byly následně měřeny u 169 pacientů (průměrný věk 62 let, rozmezí 45–82 let) s karcinomem prostaty a kontrolní skupiny 39 zdravých mužů (průměrný věk 61 let, rozmezí 54–78 let). Vyšetření TK1 bylo rozšířeno o stanovení epitopu TK210. Sérové koncentrace TK210 byly měřeny u 126 pacientů (průměrný věk 70 let, rozmezí 46–85 let) s rakovinou prostaty a kontrolní skupiny 49 zdravých mužů (průměrný věk 63 let, rozmezí 54–78 let) s nezhoubnou etiologií onemocnění včetně benigní hyperplazie prostaty.

2. studie: Koncentrace mindinu v séru byly měřeny u 56 pacientů (průměrný věk 68 let, rozmezí 45–82 let) s karcinomem prostaty a v kontrolní skupině 29 zdravých mužů (průměrný věk 64 let, rozmezí 55–78 let).

3. studie: Plazmatické koncentrace FGF23 byly vyšetřovány u 38 dospělých pacientů (31 žen ve věku 24–77 let a 7 mužů ve věku 38–75 let) s primární hyperparatyreózou. Hladiny PTH byly zkoumány těsně před incizí a po excizi adenomu. cFGF23, iFGF23, fosfát, eGFR a P1NP byly vyšetřovány intraoperačně a další den po operaci.

4. studie: Kyselina hyaluronová byla vyšetřována v synoviální tekutině 67 pacientů s průměrným věkem 67 let (35 mužů, průměrný věk 65 let a 32 žen, průměrný věk 68 let) s klinicky diagnostikovanou osteoartritidou.

Všechny studované biomarkery byly stanoveny pomocí komerčně dostupných enzymových imunochemických metod.

Výsledky: Výsledky jsou vyjádřeny jako mediány. Koncentrace thymidinkinázy 1 v séru jsou zvýšené u pacientů s karcinomem prostaty ve srovnání se skupinou zdravých mužů (0,196 pmol/L vs. 0,076 pmol/L, $P < 0,0001$, AUC = 0,80). Koncentrace thymidinkinázy jsou zvýšené u pacientů se závažným průběhem onemocnění hodnoceným dle TNM klasifikace a kritérií ISUP.

Sérové hladiny mindinu u pacientů s karcinomem prostaty byly významně sníženy ve srovnání s kontrolní skupinou (0,78 ng/mL vs. 2,12 ng/mL, $P = 0,0007$, AUC = 0,71). Koncentrace mindinu jsou sníženy u pacientů se závažným průběhem onemocnění hodnoceným dle TNM klasifikace.

Plazmatické koncentrace cFGF23 a iFGF23 významně poklesly jeden den po paratyreoidektomii, (cFGF23: 89,17 vs. 22,23 RU/mL, $P < 0,0001$, iFGF23: 56,87 vs. $< 1,5$ pg/mL, $P < 0,0001$). Plazmatické koncentrace iFGF23 a cFGF23 korelují s fosfáty (cFGF23: Spearmanův $r = -0,253$, $P = 0,0065$; iFGF23: Spearmanův $r = -0,245$, $P = 0,0085$), předoperační koncentrace iFGF23 a cFGF23 korelují s eGFR (cFGF23: Spearmanův $r = -0,499$, $P = 0,0014$; iFGF23: Spearmanův $r = -0,491$, $P = 0,0017$).

Koncentrace kyseliny hyaluronové u pacientů s osteoartritidou, kteří podstoupili artroskopii, jsou významně zvýšeny ve srovnání se skupinou pacientů s úplnou náhradou kolene (2581 mg/L vs. 1763 mg/L, $P = 0,01$). Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině korelují se zvýšeným osmotickým tlakem (Spearmanův $r = 0,29$, $P = 0,015$).

Závěr: Mindin a TK1 jsou vhodnými doplňkovými markery pro diagnostiku karcinomu prostaty. Koncentrace FGF23 v plazmě klesá jeden den po parathyroidektomii. Koncentrace kyseliny hyaluronové jsou zvýšené u pacientů po artroskopii, korelují se zvýšenou osmolalitou synoviální tekutiny a mohou proto být dalším indikátorem závažnosti onemocnění.

Imunochemické metody jsou vhodné pro diagnostiku nádorových a degenerativních onemocnění.

Klíčová slova: ELISA, rakovina prostaty, pHPT, HA, gonantróza, biomarker, TK1, mindin

Abstract

Introduction: Immunochemical methods have significant importance in biomedical research. The benefit of immunochemical methods is their high sensitivity and accuracy. The aim of the work was to use immunochemical methods in investigation of cancer biomarkers and degenerative diseases. A total of four studies were performed. Two studies were focused on the search for new biomarkers of prostate cancer, the third study was focused on evaluation of FGF23 in patients with hyperparathyroidism, and the fourth study looked at the assessment of hyaluronic acid in synovial fluid of patients with knee gonarthrosis.

Methods and patients: Study 1: Concentrations of Chromogranin A, Endoglin, TIMP-1 and thymidine kinase 1 (TK1) in serum and Endoglin, SPINK-1, Annexin, TIMP-1 in urine were measured in 58 patients (mean age 68 years, range 45 -82 years) with clinically diagnosed prostate cancer and in 30 healthy individuals (mean age 64 years, range 55-78) without clinically relevant urological history and PSA values in the reference range. Subsequently, serum TK1 levels were measured in 169 patients (mean age 62 years, range 45-82 years) with prostate cancer and in a control group of 39 healthy men (mean age 61 years, range 54-78 years). The TK 1 assay was also used to determine the TK210 epitope. Serum TK210 levels were measured in 126 patients (mean age 70 years, range 46-85 years) with prostate cancer and in a control group of 49 healthy men (mean age 63 years, range 54-78 years) with a benign etiology of the disease, including benign prostatic hyperplasia.

Study 2: Serum mindin concentrations were measured in 56 patients (mean age 68 years, range 45-82 years) with prostate cancer and in a control group of 29 healthy men (mean age 64 years, range 55-78 years).

Study 3: Plasma cFGF23 and iFGF23 levels were investigated in patients (31 women aged 24-77 years and 7 men aged 38-75 years) with primary parathyroidism included 38 adult patients with primary hyperparathyroidism due to adenoma. PTH levels were examined just before the incision and after excision of the adenoma. cFGF23, iFGF23, phosphate, eGFR and P1NP were examined intraoperatively and the next day after surgery.

Study 4: Hyaluronic acid was investigated in synovial fluid of 67 patients with the mean age of 67 years (35 men, mean age 65 years and 32 women, mean age 68 years)

with clinically diagnosed osteoarthritis were included in the study. All studied biomarkers were determined by immunochemical methods.

Results: Results are expressed as medians. Serum thymidine kinase 1 concentrations are increased in prostate cancer patients compared to the control group of healthy men (0,196 pmol/L vs. 0,076 pmol/L, $P < 0,0001$, AUC = 0,80). Thymidine kinase concentrations are elevated in patients with severe disease according to the TNM classification and the ISUP criteria.

Serum mindin levels in prostate cancer patients are significantly decreased compared to the control group (0,78 ng/mL vs 2,12 ng/mL, $P = 0,0007$, AUC = 0,71). Mindin levels are decreased in patients with severe disease according to the TNM classification.

Plasma cFGF23 and iFGF23 decreased significantly one day after parathyroidectomy, cFGF23 (cFGF23: 89,94 vs. 37,49 RU/mL, $P < 0,0001$, iFGF23: 57,78 vs. <1,5 pg/mL, $P < 0,0001$). Plasma iFGF23 and cFGF23 correlate with phosphates (cFGF23: Spearman $r = -0,253$, $P = 0,0065$; iFGF23: Spearman $r = -0,245$, $P = 0,0085$), pre-operative iFGF23 and cFGF23 correlate with eGFR (cFGF23: Spearman $r = -0,499$, $P = 0,0014$; iFGF23: Spearman $r = -0,491$, $P = 0,0017$).

Hyaluronic acid concentrations in patients with knee osteoarthritis who underwent arthroscopy are significantly increased compared to the group of patients with complete knee replacement (2581 mg/L vs. 1763 mg/L, $P = 0,01$). Concentrations of hyaluronic acid in synovial fluid correlate with increased osmotic pressure (Spearman $r = 0,29$, $P = 0,015$), and may therefore be another indicator of disease severity.

Conclusion: Mindin and TK1 are additional markers for the diagnosis of prostate cancer. Plasma FGF23 levels decrease one day after parathyroidectomy. Hyaluronic acid concentrations in synovial fluid are elevated in patients subjected to arthroscopy and correlate with increased synovial fluid osmolality. Immunochemical methods are appropriated for the diagnosis of cancer and degenerative diseases.

Keywords: ELISA, prostate cancer, pHPT, hyaluronic acid, gonarthrosis, biomarker, thymidinkinase 1, mindin

Prohlášení

Prohlášení

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

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

V Praze, 17.5.2021

Lenka Hanousková

.....

Podpis autora

Poděkování

Děkuji doc. Ing. Karlu Kotaškovi, Ph.D., vedoucímu mé dizertační práce, za vedení, zájem, trpělivost, připomínky a čas, který mi věnoval.

A také děkuji mému příteli a blízkým přátelům za psychickou podporu během studia.

OBSAH

1. ÚVOD	11
1.1. IMUNOCHEMIE – ZÁKLADNÍ POJMY	12
1.2. ANTIGENY A HAPTENY	12
1.3. PROTILÁTKY	12
1.3.1. Příprava protilátek	14
1.3.2. Reakce antigen- protilátka	17
1.4. IMUNOCHEMICKÉ METODY	17
1.4.1. Principy imunochemických metod	19
1.4.2. Precipitační a neprecipitační metody	20
1.4.3. Kompetitivní a nekompetitivní metody	21
1.4.4. Heterogenní a homogenní metody	23
1.4.5. Imunochemické metody se značenými reaktanty	24
1.4.5.1. Izotopové metody	24
1.4.5.2. Neizotopové metody (enzymová imunoanalýza)	25
1.4.5.3. Neenzymové neizotopové metody	34
1.4.6. Další imunochemické metody:	38
1.5. CHARAKTERISTIKY IMUNOCHEMICKÝCH METOD	42
1.5.1. Základní charakteristiky	42
1.5.2. Interference	43
1.6. IMUNOCHEMICKÉ METODY A BIOMARKERY	44
1.6.1. Biomarkery a jejich vlastnosti	44
1.6.2. Klasifikace biomarkerů dle složení	45
1.7. BIOMARKERY NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	46
1.7.1. Nádorové biomarkery karcinomu prostaty	46
1.7.1.1. Přehled diagnosticky významných biomarkerů karcinomu prostaty	47
1.7.1.2. Některé nově využívané biomarkery karcinomu prostaty	49
1.7.2. Biomarkery primární hyperparatyreózy a kalciofosfátového metabolismu	51
1.8. BIOMARKERY DEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ POHYBOVÉHO APARÁTU	57
1.8.1. Gonartróza	57
2. CÍLE PRÁCE	59
3. PRAKTICKÁ ČÁST	60
3.1. HLEDÁNÍ NOVÝCH BIOMARKERŮ KARCINOMU PROSTATY	60
3.2. SLEDOVÁNÍ PERIOPERAČNÍ DYNAMIKY FGF23 U PACIENTŮ S PRIMÁRNÍ HYPERPARATHYREÓZOU	64
3.3. POSOUZENÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ KYSELINY HYALURONOVÉ V DIAGNOSTICE DEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ KLOUBŮ (GONARTRÓZA KOLENE)	65
3.4. STATISTICKÉ METODY	66
4. VÝSLEDKY	68
4.1. Hledání nových biomarkerů karcinomu prostaty	68
4.2. Sledování perioperační dynamiky FGF23 u pacientů s primární hyperparatyreózou	75
4.3. Posouzení možnosti využití kyseliny hyaluronové v diagnostice degenerativních onemocnění kloubů (gonartróza kolene)	78
4. DISKUZE	82
5. ZÁVĚRY	89
6. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	90
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	92

Seznam zkratek

AFP - alfa-1-fetoprotein

AP, ALP - alkalická fosfatáza

AUC - area under the curve = plocha pod křivkou

BCR – receptory B-lymfocytů **β-CTx** - β -

CrossLaps

Ca - vápník

CASR – receptor detekující vápník

CCD – Charge-Coupled Device = zařízení s vázanými náboji

CEDIA - Cloned Enzyme Donor Immunoassay -klonovaný imunotest dárce enzymu

CKD - chronické onemocnění ledvin

CLIA - chemiluminiscenční imunoanalýza

CMIA - Comparison of chemiluminescent microparticle immunoassay

- chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích **CV** – variační

koeficient

DAS – ELISA double antibody Enzyme-linked immunosorbent assay

– dvouprotilátkově enzymově vázaný imunosorbentní test

DELFA - Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay -

disociačně vylepšený lanthanidový fluorescenční imunologický test **DNA** –

deoxyribonukleová kyselina

EA – akceptor enzymu

ECLIA - elektrochemiluminiscenční imunoanalýza

ECT – extracelulární tekutina

ED – dárce enzymu

EIA - enzymová imunoanalýza

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay - enzymově vázaný imunosorbentní test

EMIT - Enzyme Multiplied Immunoassay Technique - enzymová multiplikovaná

imunoanalýza

EAU – Evropská asociace pro urologii

FELISA - fluorescenční enzymově vázaný imunosorbentní test

FGF-23 - Fibroblastový růstový faktor 23

FIA - fluorescenční imunoanalýza

FPIA- Fluorescence Polarization Immunoassay - fluorescenční polarizační imunoanalýza

fPSA- volný prostatický specifický antigen

GA – gonartróza

GFR – glomerulární filtrace

GS – Gleasonovo skóre

HA - kyselina hyaluronová

HAT - lidský alfa-thrombin

HAV – virus hepatitidy A

HBsAg – povrchový antigen hepatitidy B

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HRP – křenová peroxidáza

ILMA - imunoluminoimunoanalýza

IgA – imunoglobulin A

IgD - imunoglobulin D

IgE - imunoglobulin E

IgG- imunoglobulin G

IgM - imunoglobulin M

IQR – mezikvartilový rozptyl

IRMA - imunoradiometrická analýza

ISUP - International Society of Urological Pathology – mezinárodní společnost urologické patologie

LIA - luminoimunoanalýza

LOCI – Luminescent oxygen channeling assay - luminiscence založena na přenosu kyslíku

MEIA – Microparticle Enzyme Immunoassay - mikročasticová enzymová imunoanalýza

MMP9 - matricová metaloproteináza 9

NK- buňky – natural killer cells, přirození zabíječi buněk

PHI - index zdravé prostaty

pHPT - primární hyperparatyreoidismus

P1NP - aminotermální propeptid prokolagenu typu 1

PRG4 - proteoglykan 4

PSA - prostatický specifický antigen

PSTI - inhibitor pankreatické sekrece trypsinu

PTH - parathormon

PTHR – receptor pro parathormon

REA - radioenzymová imunoanalýza

RIA - radioimunoanalýza

RNA – ribonukleová kyselina

ROC – Receiver Operating Characteristic = operační charakteristika přijímače

RTG – rentgenové záření

sHPT - sekundární hyperparatyreoidismus

SiO₂ – oxid křemičitý

SPIA – imunoanalýza na pevných částicích

SPINK-1 - serin proteázový inhibitor Kazal-typ 1

TATI - inhibitor trypsinu asociovaný s nádorem

TEP – totální endoprotéza

TGFβ - transformující růstový faktor β

TIMP - tkáňový inhibitor metaloproteináz

TK - thymidinkináza

TPA - tripropylamin

TRACE - Time Resolved Amplified Cryptate Emission

- časově rozlišená emise zesíleného kryptátu

1. ÚVOD

Imunochemické metody jsou důležitým pomocníkem klinických lékařů i odborníků v biomedicíně výzkumu. Lékaři mnoha specializací dnes využívají výsledky imunochemických stanovení při klinickém rozhodování v otázkách diagnostiky, terapie a sledování závažných onemocnění (Karlíková, *et al.*, 2013). První imunochemické metody byly vyvinuty na konci devatenáctého století a okamžitě byly aplikovány v lékařské diagnostice a bakteriologii. Vývoj těchto metod, který byl zvláště patrný od poloviny minulého století, způsobil značný nárůst jejich uplatnění v lékařské diagnostice a svědčil jim zásadní roli ve výzkumu v různých oblastech biologických věd. Pokrok v imunotechnologii rozšířil jejich využití v nových oblastech, např. v kontrole kvality potravin či životního prostředí (Koivunen, *et al.*, 2006). Rozvoj automatizace umožnil imunochemickým metodám stát se nedílnou součástí laboratorní diagnostiky a důležitým pomocníkem klinických lékařů i odborníků v biomedicíně výzkumu. Současné imunoanalytické metody (imunoanalýzy, imunoeseje) jsou jednoduché metody, které jsou snadno proveditelné a dobře automatizovatelné. Vyznačují se vysokou citlivostí a přesností (detekční limity řádově dosahují hodnot 10^{-15} až 10^{-20} mol/L), což umožňuje jejich využití pro rutinní analýzy látek s velmi nízkou koncentrací, např. hormonů, nádorových markerů, cytokinů, virů (Karlíková, *et al.*, 2013). Imunochemické stanovení analytů o nízké koncentraci v biologickém materiálu dnes patří k rutinním a široce používaným technikám laboratorní medicíny. Klasické imunochemické metody, jako jsou imunoprecipitace, imunodifúze, imuno elektroforéza apod., se dnes v klinických laboratořích využívají převážně pro kvalitativní nebo semikvantitativní účely.

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na využití imunoanalytických metod v diagnostice nádorových onemocnění (Annexin, SPINK-1, TIMP, Chromogranin A, Endoglin, Thymidinkináza 1, Mindin jako biomarkery karcinomu prostaty, dále stanovení FGF23 u pacientů s primární hyperparathyreózou) a degenerativních onemocnění (stanovnění kyseliny hyaluronové u pacientů s artrózou kolene).

1.1. Imunochemie – základní pojmy

Imunochemie je vědní obor zabývající se interakcí mezi antigenem a protilátkou. Antigeny reagují s protilátkami pomocí strukturních rysů na jejich povrchu prostřednictvím „epitopů“ nebo „antigenních determinantů“, které se vážou na specifické struktury protilátek s názvem „paratopy“ nebo „místa vázající antigen“. Protilátky lze získat ze séra imunizovaných zvířat. Tyto poznatky vedou k vytváření a aplikaci analytických metod, které umožňují specifické a citlivé stanovení nejrůznějších analytů (Koivunen, *et al.*, 2006; Daussant, *et al.*, 2007).

1.2. Antigeny a hapteny

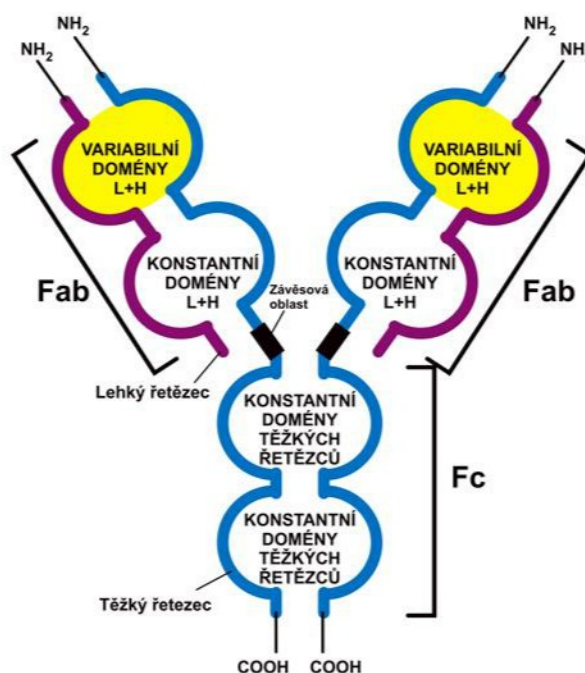
Antigeny jsou látky, které rozpozná imunitní systém jako cizí a odpoví na ně tvorbou protilátek. Nejčastější antigeny jsou makromolekuly – proteiny, komplexní polysacharidy, lipopolysacharidy, apod. Antigeny mohou být přírodní či syntetické.

Hapteny jsou malé molekuly, které dokážou vyvolat imunitní odpověď až po navázání na makromolekulární nosič. Oblast molekuly antigenu, která je rozeznávána imunitními receptory, se nazývá epitop. Vazba epitopu na protilátku je zprostředkována nekovalentními vazbami za vzniku imunokomplexů.

1.3. Protilátky

Protilátky jsou secernovány po vazbě antigenu a dalších signálních molekul na receptory B-lymfocytů (BCR). Vazba antigenu vyvolá diferenciaci B-lymfocytů na plazmatické buňky a vytvoří se příslušné protilátky (Hořejší, *et al.*, 2017).

Protilátka je složena ze dvou těžkých řetězců, které jsou kovalentně spojeny cystinovými můstky, ke každému těžkému řetězci je následně dalším cystinovým můstkem připojen lehký řetězec. Těžké řetězce se skládají ze 4 domén. Jednotlivé domény jsou vzájemně spojeny polypeptidovým řetězcem. N-koncové domény jsou variabilní. Variabilní domény vytváří vazebné místo. Ostatní domény jsou konstantní. Pokud molekulu imunoglobulinu rozštěpíme pomocí enzymu papainu získáme tzv. Fab fragmenty, které obsahují vazebné místo pro antigen a Fc fragment. Struktura imunoglobulinu je na obrázku 1.



STRUKTURA MONOMERU IMUNOGLOBULINU

Obrázek 1: Struktura monomeru imunoglobulinu (Vodičková, 2010)

Jsou známy 2 typy lehkých řetězců (κ , λ) a 5 typů těžkých řetězců (μ , δ , α , γ , ϵ).

Dle typu těžkých řetězců a počtu jednotek tvaru Y rozeznáváme 5 typů imunoglobulinů. Imunoglobulin M (IgM), imunoglobulin D (IgD), imunoglobulin A (IgA), Imunoglobulin G (IgG), Imunoglobulin E (IgE). Plazmatická buňka může tvořit více typů imunoglobulinů najednou, ale vždy specificky pro určitý antigen.

IgM se nacházejí na povrchu buněk B-lymfocytů a tvoří pentamer. Jedná se o největší typ imunoglobulinu. IgM je první izotyp protilátek, který se tvoří po setkání s antigenem.

IgD je v séru zastoupen málo a nachází se na povrchu B-lymfocytů, kde má funkci receptoru pro antigen. Vyvolává uvolňování histaminu z bazofilů a mastocytů.

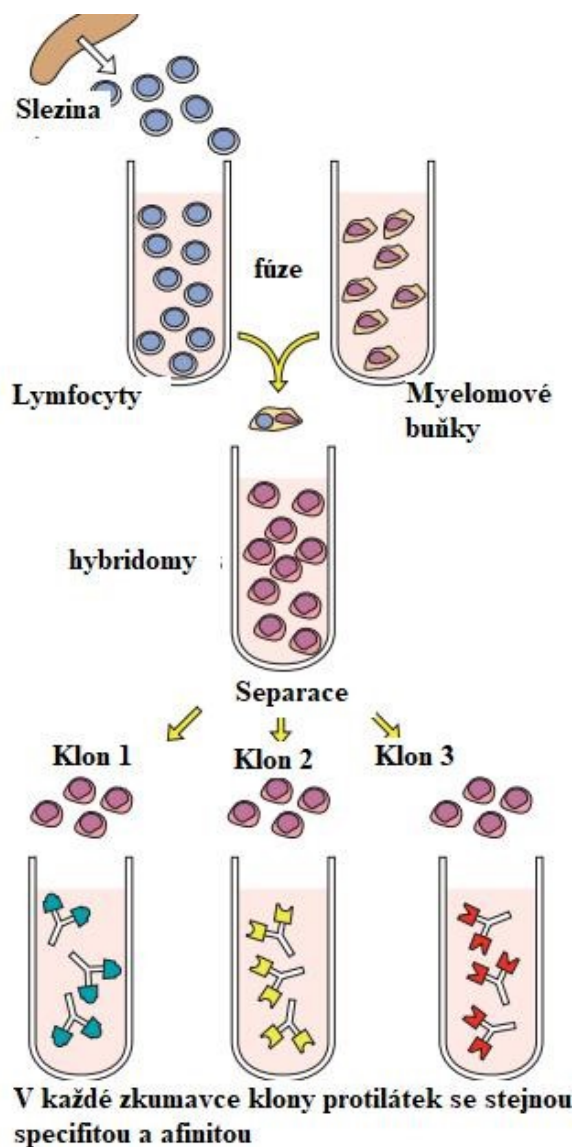
IgG je nejhojnějším typem protilátek. Jsou známy 4 subtypy IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. IgG je tvořen jako monomer.

IgA se vyskytuje ve formě slizniční a sérové. Slizniční forma IgA je tvořena dimery, zatímco sérová forma tvoří monomery, dimery i trimery. IgA slouží převážně jako opsonin a existují jeho 2 subtypy IgA1 a IgA2.

IgE se fyziologicky vyskytuje u lidí v nepatrných koncentracích. IgE je monomer, který se účastní imunitní odpovědi proti mnohobuněčným organismům anebo je přítomen také u alergických reakcí (Hořejší, *et al.*, 2017).

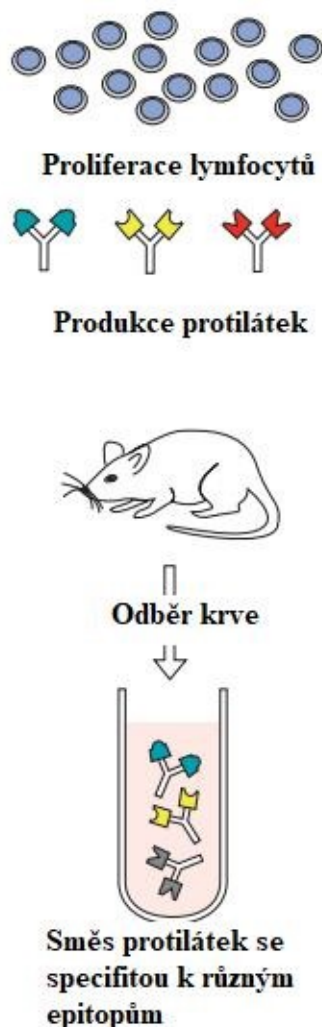
1.3.1. Příprava protilátek

Protilátky jsou monoklonální a polyklonální. Monoklonální protilátky můžeme získat i *in vitro*. Monoklonální protilátky se získávají pomocí izolace klonů B-lymfocytů, které tvoří protilátky požadované specifity a jsou pěstovány v buněčné kultuře. B-lymfocyty mají krátkou životnost. Pomocí jejich fúze s vhodnou myelomovou buněčnou linií vzniká hybridom. Tato hybridní buňka roste neomezeně ve tkáňové kultuře a produkuje stejné protilátky jako původní B-lymfocyt. Protilátky jednoho klonu plazmocyty mohou převládat v organismu za patologické situace, což může být způsobeno nádorem z plazmatických buněk tzv. myelomem. Popis přípravy monoklonálních protilátek je znázorněn na obrázku 2.



Obrázek 2: Popis přípravy monoklonálních protilátek – upraveno podle (Daussant, *et al.*, 2007)

Polyklonální protilátky jsou produktem různých klonů plazmocyťů. Toho se využívá při výrobě polyklonálního antiséra, které získáme po imunizaci experimentálního zvířete. Popis přípravy polyklonálních protilátek je na obrázku 3.



Obrázek 3: Popis přípravy polyklonálních protilátek – upraveno podle (Daussant, *et al.*, 2007)

Pro léčebné a diagnostické použití se nejprve využívaly monoklonální myší protilátky. Dnes jsou protilátky upravovány metodami genetického inženýrství, kdy je část imunoglobulinu, která netvoří vazebné místo, nahrazena částmi lidského imunoglobulinu (Daussant, *et al.*, 2007; Hořejší, *et al.*, 2017).

1.3.2. Reakce antigen-protilátka

Vazba antigenu na protilátku je zprostředkována nekovalentními reverzibilními interakcemi, zejména iontovými, hydrofobními, dále van der Waalsovými silami a vodíkovými můstky. Rychlost vzniku a rozpadu vazby vyjadřuje disociační konstanta.

První funkcí protilátek je vázání toxinů nebo virů, což zabraňuje těmto cizorodým látkám ve vazbě na cílové receptory. Dále protilátky mikroorganismy opsonizují, tedy označují je jako cíl pro složky buněčné imunity (fagocyty, NK-buňky, atd.). Schopnost protilátek vázat se na specifický antigen je unikátní síla vazby mezi jedním epitopem a jedním paratopem na protilátce, to se označuje jako afinita, zatímco avidita označuje sílu interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem (Bartůňková, *et al.*, 2011).

Ke zkříženým reakcím může docházet u antigenů, které jsou si podobné. Tyto reakce vznikají například při imunitní odpovědi zaměřené proti virům, které jsou strukturně podobné. Tyto podobnosti antigenních struktur často komplikují diagnostiku pomocí imunochemických metod (Daussant, *et al.*, 2007).

1.4. Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na principu reakce antigenu s protilátkou. Můžeme také použít pro zpřesnění pojmy receptor a ligand, jelikož protilátka v reakci při stanovení může být daným antigenem a v reakci reaguje s další protilátkou.

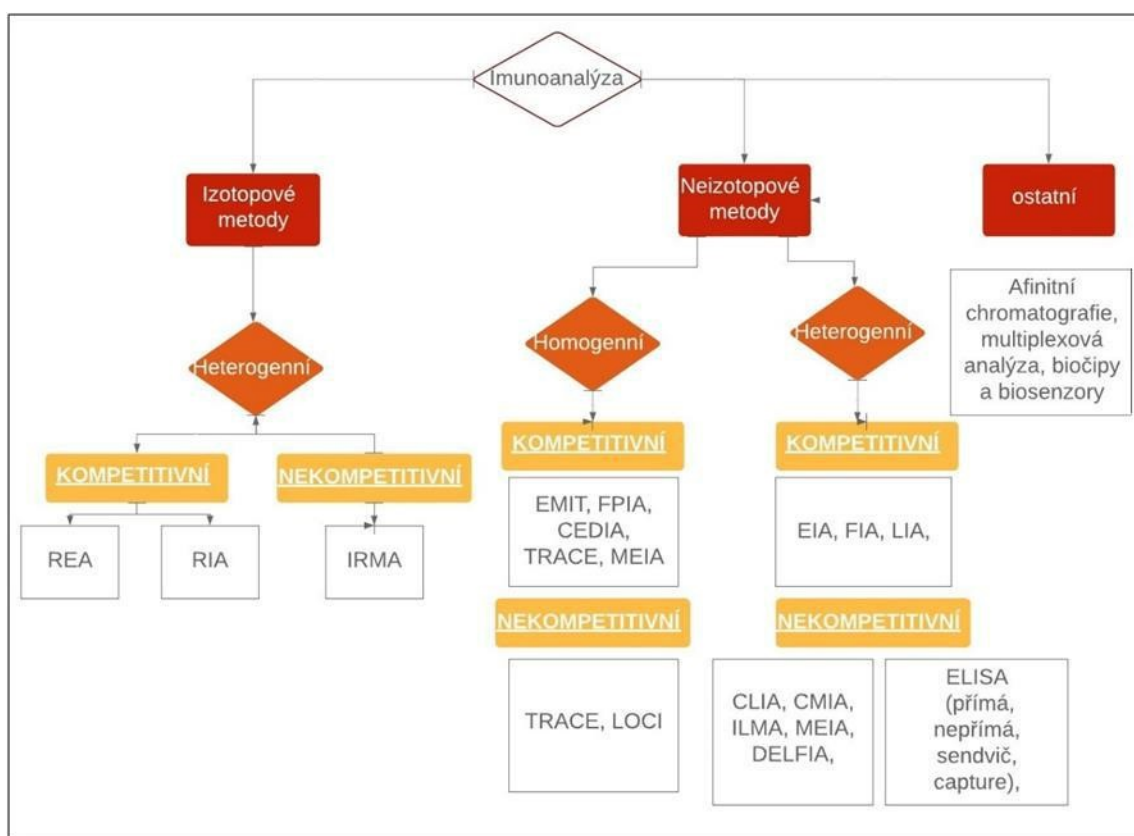
V roce 1929 byla popsána tzv. precipitační reakce, což je reakce rozpustného antigenu s odpovídající protilátkou (Bartůňková, *et al.*, 2011). Tento princip je uplatněn u různých modifikací, které se liší potřebou separace reaktantu od jeho vázané formy, pak se jedná o metody heterogenní. Metody, které separaci nevyžadují, jsou homogenní. Dále můžeme metody rozlišit dle použitého indikátoru a způsobu detekce. Jako indikátory se využívají fluorescenční, chemiluminiscenční látky, cheláty lanthanidů, komplexy těžkých kovů, stabilní volné radikály, feritin, koenzymy a enzymy nebo jejich inhibitory. Tabulka 1 popisuje dělení imunochemických metod dle typu indikátoru a způsobu detekce (Koivunen, *et al.*, 2006; Wild, *et al.*, 2013).

Tabulka 1: Dělení imunochemických metod dle typu indikátoru (značky) a způsobu detekce

Imunochemické metody				
		Metoda	Značka	Detekce
V roztoku	V gelu	<i>Jednoduchá imunodufúze</i>	žádná	Vyhodnocení precipitačních linií
		<i>Dvojitá imunodufúze</i>	žádná	Vyhodnocení precipitačních linií
		<i>Turbidimetrie</i> <i>Imunoelektroforéza</i>	žádná žádná	Vyhodnocení precipitačních linií
	V roztoku			Měření vzniklého zákalu
		<i>Nefelometrie</i>	žádná	Měření vzniklého zákalu
		<i>Latexová aglutinace</i>	žádná	Hodnocení vzniku precipitátu
	izotopové	<i>Radioimunoanalýza</i>	radioizotop (^{125}I , ^{131}I , ^{14}C)	Měření radioaktivity
		<i>Technika volných radikálů</i>	stabilní volné radikály	Elektronová spinová rezonance
	neizotopové	<i>Enzymové</i>	enzym (křenová peroxidasa, alkalická fosfatáza)	Spektrofotometrie barevného produktu
		<i>Fluorescenční</i>	fluorofor (fluorescein, rhodamin B, umbeliferon, lanthanidů)	Měření fluorescence
		<i>Chemiluminiscenční</i>	luminofor (luciferin, akridinester, adamantyl dioxoetan)	Měření luminiscence
		<i>Elektrochemiluminiscenční</i>	tripropylamin	Měření luminiscence
V roztoku		<i>Afinitní chromatografie</i>	žádná, enzym, fluorofor	hmotnostní spektrometrie
		<i>Biosenzory</i>	enzym, fluorofor	spektrofotometrie, měření fluorescence či luminiscence

1.4.1. *Principy imunochemických metod*

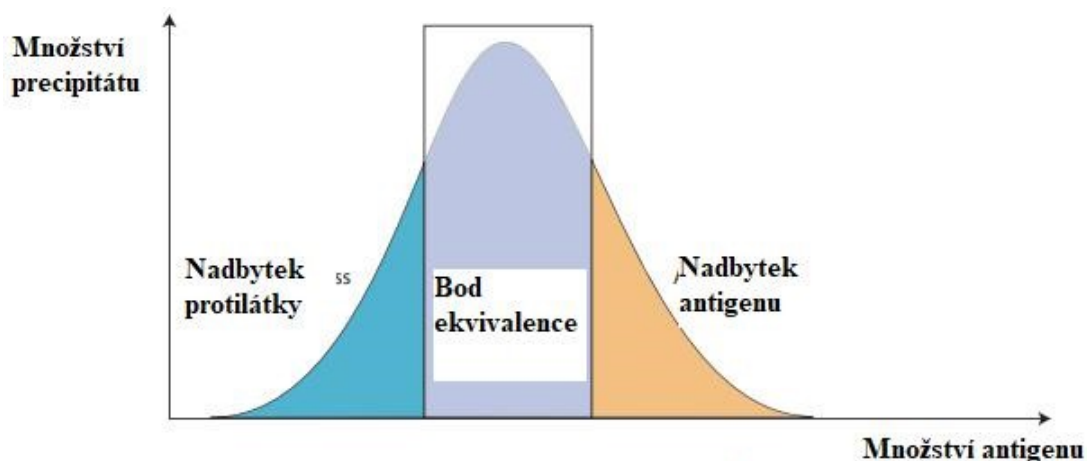
Imunochemické metody se dělí dle několika charakteristik. Dle vzniku precipitátu nebo imunokomplexu. K vytvoření rozpustného imunokomplexu dochází při jakékoliv koncentraci antigenu a protilátky v roztoku, zatímco imunoprecipitát se tvoří v pouze určitém poměru v tzv. bodu ekvivalence. Dále se metody dělí dle uspořádání, potřeby separace a způsobu značení. Přehled imunochemických metod je znázorněn na obrázku 4.



Obrázek 4: Přehled vybraných imunochemických metod: radioenzymová imunoanalýza (REA), radioimunoanalýza (RIA), imunoradiometrická analýza (IRMA), enzymová multiplikovaná imunoanalýza (EMIT), fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA), klonovaný imunotest dárce enzymu (CEDIA), časově rozlišená emise zesíleného kryptátu (TRACE), mikročásticová enzymová imunoanalýza (MEIA), luminiscence založena na přenosu kyslíku (LOCI), enzymová imunoanalýza (EIA), fluorescenční imunoanalýza (FIA), luminoimunoanalýza (LIA), chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA), chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích (CMIA), imunoluminoimunoanalýza (ILMA), disociačně vylepšený lanthanidový fluorescenční imunologický test (DELFI), enzymově vázaný imunisorbentní test (ELISA)

1.4.2. Precipitační a neprecipitační metody

Precipitační metody jsou založeny na tvorbě precipitátu. Precipitát může vytvářet pouze antigen, ale nemůže ho vytvářet hapten, který je příliš malý pro tvorbu precipitátu. Imunoprecipitace probíhá v roztoku, kdy se tvoří nerozpustný komplex rozpustného antigenu s protilátkou. Kvantitativně lze precipitát stanovit turbidimetricky či nefelometricky. Velmi podobná reakce je aglutinace, kdy reaguje nerozpustný antigen s protilátkou za vzniku aglutinátu. Vznik precipitátu probíhá nejprve rychle, než dojde k dosažení bodu ekvivalence, kdy je stejné množství antigenu a protilátky. Po překročení bodu ekvivalence dochází k zpomalení reakce a rozpadu imunokomplexů, což vede k falešně negativním výsledkům. Tento vztah je vyjádřen Heidelberger-Kendallovou kvantitativní imunoprecipitační křivkou (viz. Obrázek 5).



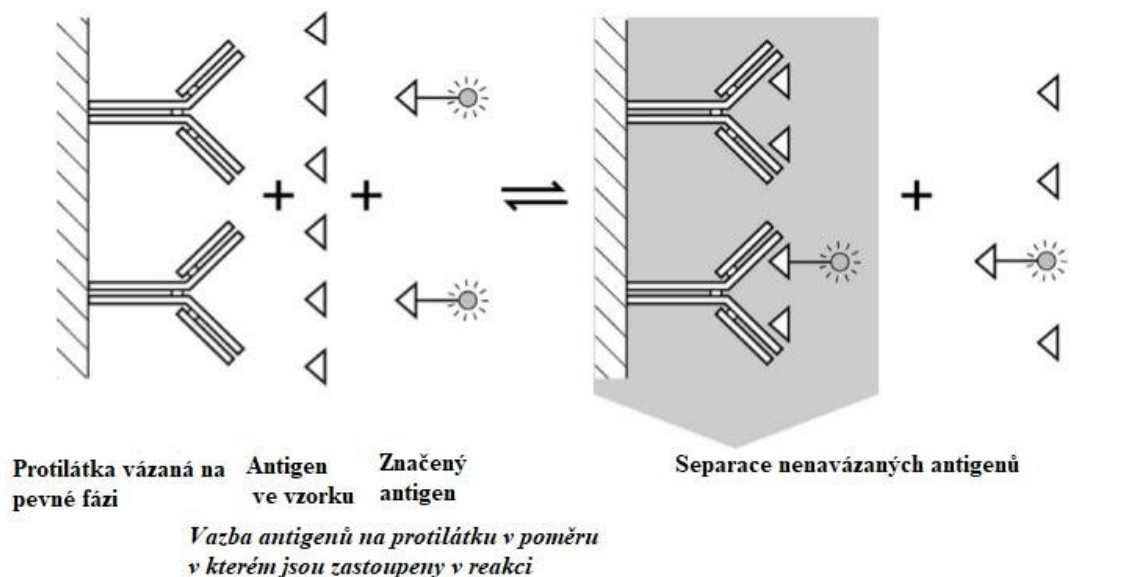
Obrázek 5: Imunoprecipitační křivka – upraveno podle (Daussant, *et al.*, 2007)

Imunoprecipitace může probíhat také v gelu. Využívá se schopnost difúze antigenu, protilátky či obou v gelu, kdy v dosažení bodu ekvivalence dochází k tvorbě imunoprecipitačních linií.

Neprecipitační metody se využívají k detekci nízkých koncentrací antigenu či protilátky, když nevzniká precipitát. Stanovení imunokomplexu je možné po vazbě vhodné značky na jeden z reaktantů před samotnou reakcí. Díky signálu značky lze poté stanovit velmi nízké koncentrace reaktantu. K značení jsou vhodné enzymy (křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza), fluorescenční látky (fluorescein), chemiluminiscenční látky (luminol), radionuklidy (^{125}I , ^{14}C) (Bartůňková, *et al.*, 2011).

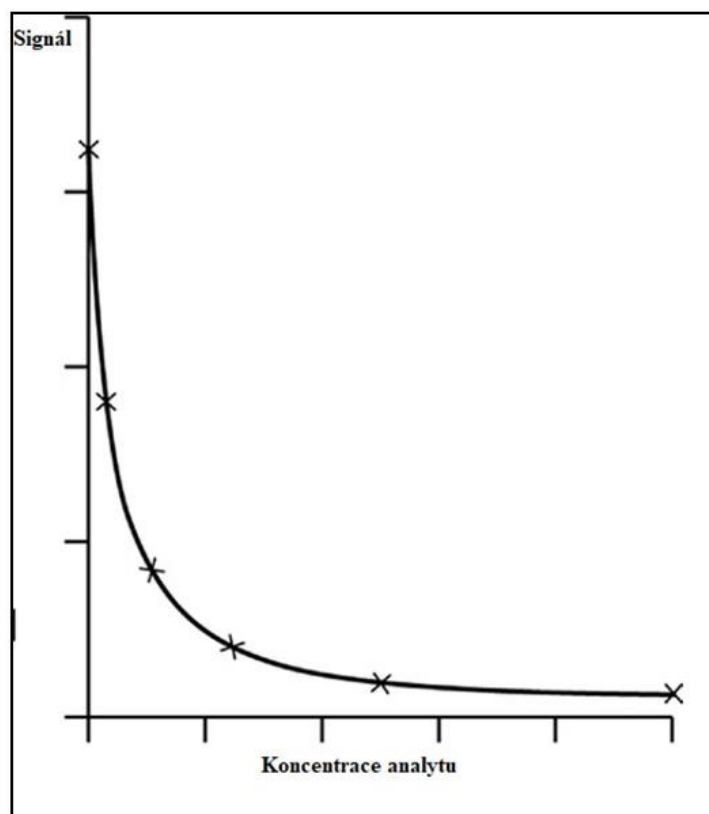
1.4.3. Kompetitivní a nekompetitivní metody

Kompetitivní metody jsou metody, kdy neznačený analyt soutěží se značeným antigenem o vazebné místo na protilátce. Princip kompetitivní metody je zobrazen na obrázku 6.



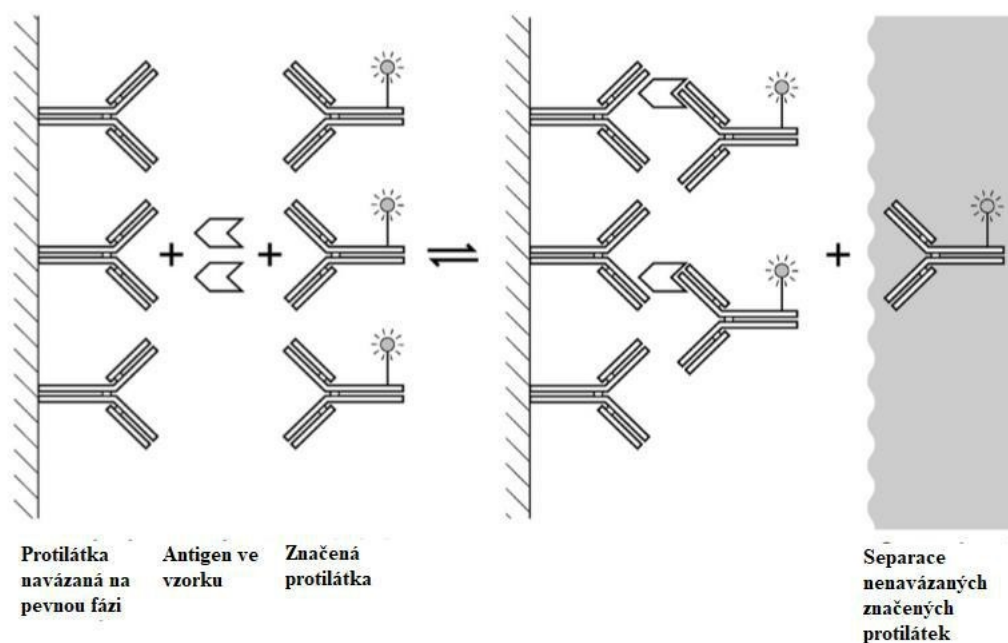
Obrázek 6: Kompetitivní stanovení – upraveno dle (Wild, *et al.*, 2013)

Koncentrace stanovovaného analytu je v tomto případě nepřímo úměrná detekovanému signálu (viz. Obrázek 7).



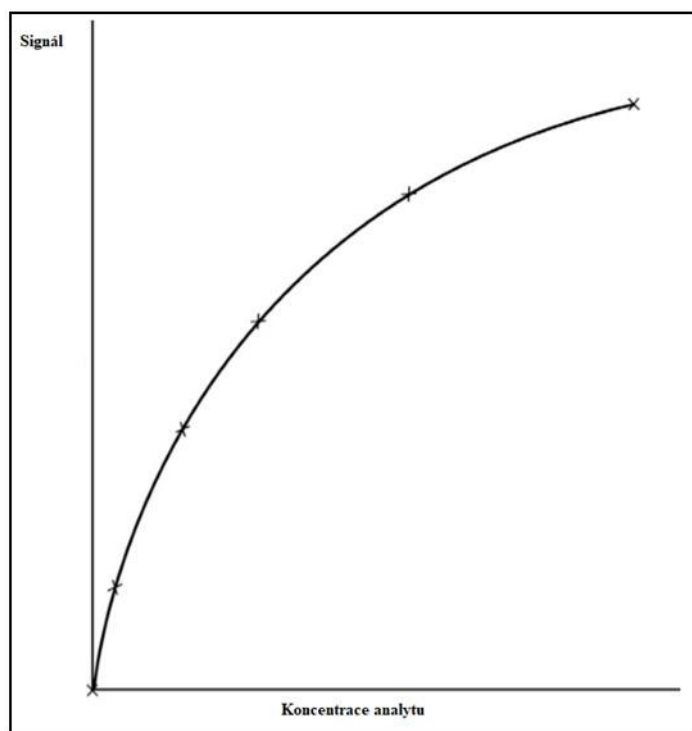
Obrázek 7: Kalibrační závislost kompetitivní metody – upraveno dle (Wild, *et al.*, 2013)

Nekompetitivní metody jsou metody, při kterých jsou použity dvě protilátky (značená a nezačtená), které jsou v reakci v přebytku. Princip kompetitivní metody je zobrazen na obrázku 8.



Obrázek 8: Nekompetitivní stanovení – upraveno dle (Wild, *et al.*, 2013)

Koncentrace stanovovaného analytu je v tomto případě přímo úměrná detekovanému signálu (Springer, *et al.*, 2008). Kalibrační závislost nekompetitivních metod je zobrazena na obrázku 9.

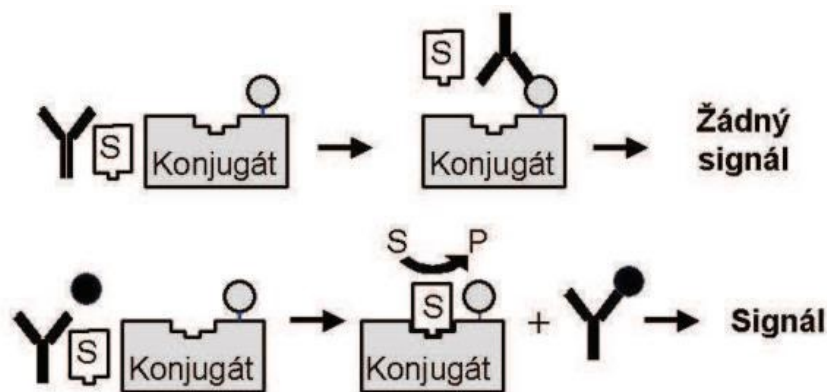


Obrázek 9: Kalibrační závislost nekompetitivních metod – upraveno dle (Wild, *et al.* 2013)

1.4.4. Heterogenní a homogenní metody

Heterogenní metody vyžadují separaci imunokomplexu od značeného antigenu/protilátky. Interakce antigenu se značenou protilátkou neovlivňuje celkovou intenzitu signálu značky (fluorescence, radioaktivita apod.). V tomto typu reakce je potřeba oddělit imunokomplex s navázanou značenou protilátkou od značené protilátky nacházející se volně v roztoku. Příklad heterogenní reakce je na obrázku 6.

Homogenní immunoanalýzy na rozdíl od heterogenních analýz nevyžadují separaci značených složek. Tyto analýzy jsou jednodušší a rychlejší, jelikož signál je ovlivněn navázáním antigenu na protilátku, a díky tomu není potřeba další separace, jak ukazuje obrázek 10 (Karlíková, *et al.*, 2013).



Obrázek 10: Homogenní immunoanalýza (Karlíková, *et al.*, 2013)

1.4.5. Imunochemické metody se značenými reaktanty

1.4.5.1. Izotopové metody

Již v roce 1895 byly objeveny W.K.Röntgenem neznámé paprsky, později nazývané jako rentgenové. Ve stejnou dobu A. H. Becquerel objevil záření gama. Následovaly objevy, které vedly k zavedení oboru nukleární medicína. V roce 1937 byl poprvé využit radioaktivní sodík. Následující rok se rozšířilo využití dalších izotopů např. ^{125}I , ^{131}I , ^3H , ^{14}C , ^{35}S . Radioizotopové metody se začaly využívat v medicíně již v roce 1948, kdy byla objevena metoda izotopového ředění. Imunoanalýza byla poprvé použita pro stanovení inzulínu a následně pro stanovení steroidních hormonů (Dientsbier, 1971).

Tyto metody v 70. letech minulého století zažily velký rozvoj a začaly být využívány k detekci dalších biologických látek. Radioimunoanalytické metody (RIA) jsou založeny na principu kompetitivní reakce, kdy radioaktivně značené molekuly soutěží s neoznačenými molekulami hormonů o vazebné místo na odpovídajících protilátkách (Skelley, *et al.*, 1973). První RIA metody byly poměrně zdlouhavé a pracné, ale citlivé. Dostupnost analýz hormonů, léčiv, proteinů, virů a mnoho dalších umožnilo zlepšit zdravotní péči a uskutečnit první screeningové programy (Lapčík, 2009).

Mezi čteně využívané radioizotopy patří ^3H , ^{14}C , ^{57}Co , ^{131}I , a nejčastěji ^{125}I . Díky své citlivosti a reprodukovatelnosti jsou považovány za zlatý standard i v dnešní době. Analýza izotopovými metodami je zatížena přísnější legislativou, než je legislativa u metod neizotopových (Daussant, *et al.*, 2007).

1.4.5.1.1. Přehled izotopových metod

Radioimunoanalýza (RIA) je kompetitivní metoda, kdy značený a neznačený antigen soutěží o omezené množství protilátky.

Imunoradiometrická analýza (IRMA) je nekompetitivní, sendvičová metoda. Využívá ke stanovení antigenu neznačenou protilátku uchycenou na pevné fázi (dno zkumavky, magnetické částice) a značenou protilátku, která se přidává v nadbytku po interakci antigenu se značenou protilátkou (Karlíková, *et al.*, 2013; Dientsbier, 1971).

Radioenzymová imunoanalýza (REA) je založena na specifické reakci enzymu a odpovídajícího substrátu s detekcí radioaktivity pomocí vhodného radioindikátoru. Příkladem může být např. stanovení thymidinkinázy od firmy Beckman Coulter. Stanovení je založeno na enzymatické fosforylaci jodem značeného substrátu 5-¹²⁵I-deoxyuridinu thymidinkinázou ve vzorku za vzniku 5-joddeoxyuridin monofosfátu. Ten se oddělí od zbylé reakční směsi sorbcí na ionexu a u sorbentu měříme radioaktivitu. Intenzita signálu je přímo úměrná aktivitě TK ve vzorcích (Příbalový leták Immunotech, V04, 2017).

1.4.5.2. Neizotopové metody (enzymová imunoanalýza)

RIA metody byly postupem času z velké části nahrazeny metodami s enzymovým markem – enzymovými imunoanalýzami, enzymovými imunoesejemi. (EIA). Většina komerčně dostupných enzymových imunoesejí vyžaduje separaci specifických antigenů. Jedná se zejména o imunoanalýzu na pevných částicích (SPIA) nebo enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA) (Koivunen, *et al.*, 2006).

ELISA byla vyvinuta v roce 1971 jako modifikace metody RIA. Poprvé byla využita při stanovení IgG protilátek v séru králíka. Antigen byl označen enzymem alkalické fosfatázy (AP) (Aydin, 2015).

Ve stejném období byla publikována práce zabývající se stanovením koncentrace gonadotropinu v moči. Metoda na stanovení gonadotropinu využívala značenou protilátku křenovou peroxidázou (HRP) (Lequin, 2005). Během 80-tých let minulého století začala výroba plně automatizovaných analyzátorů využívajících princip enzymových imunoanalýz (Lequin, 2005).

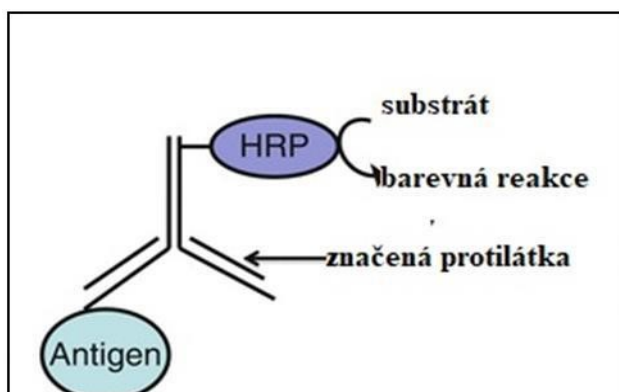
Je známo několik typů enzymových imunoesejí (viz. Obrázek 4) - homogenní (nevyžadují separaci) a heterogenní (je potřeba separace), dále přímá, nepřímá, sendvičová (nekompetitivní) a kompetitivní. (Aydin, 2015).

Základní princip metody ELISA spočívá v navázání antigenu na pevnou fázi zkumavek či mikrodestiček polystyrenu či polypropylenu. Pro značení antigenů/protilátek se nejčastěji využívají enzymy alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza, galaktosidáza, připojené pomocí Fc-fragmentu. Po navázání značené protilátky k antigenu se do reakce přidá substrát, který je štěpen daným enzymem. Vzniklá barevná změna odpovídá koncentraci analyzovaného analytu (Bartůňková, *et al.*, 2011).

1.4.5.2.1. Přehled enzymatických metod

1. Heterogenní metody

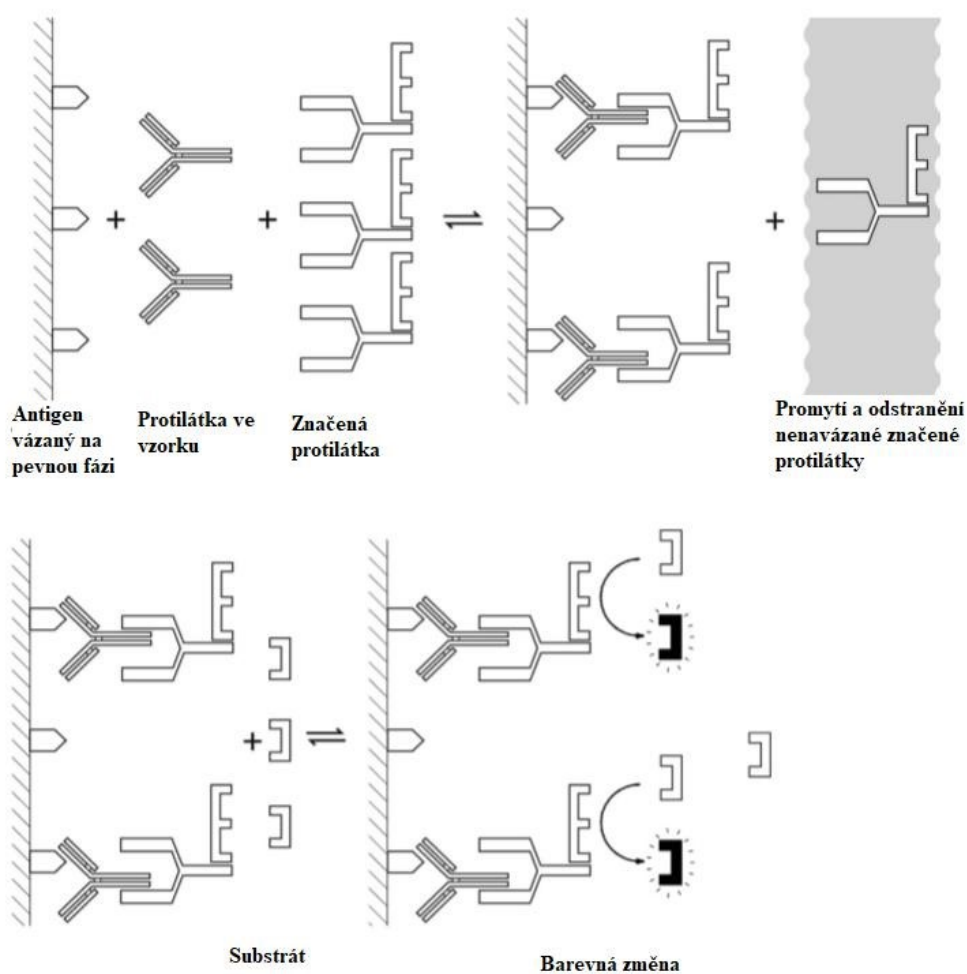
Přímá ELISA je nejjednodušším typem enzymové imunoanalýzy. Nejprve je neznačený antigen adsorbován na pevnou fázi, poté je přidán přebytek jiného proteinu (obvykle hovězí sérový albumin), aby se blokovala všechna další vazebná místa. Enzym se spojí s protilátkou v samostatné reakci. Komplex enzym-protilátka je následně přidán k navázanému antigenu a po vymytí nadbytku komplexu zůstane část navázaná na antigen. Po přidání substrátu, který je enzymem katalyzován, je zaznamenán signál odpovídající koncentraci navázaného antigenu. Postup je rychlejší oproti ostatním typům metod ELISA. Princip přímé ELISY je založen na reakci jedné protilátky s jedním antigenem (Obrázek 11).



Obrázek 11: Přímá ELISA - (Lin, 2015)

Reakce zahrnuje méně kroků pracovního postupu (promývání), a díky tomu se jedná o rychlou analýzu. Přímá ELISA se využívá k testování specifických reakcí protilátka-antigen. Stanovení eliminuje zkříženou reaktivitu mezi druhotně podobnými

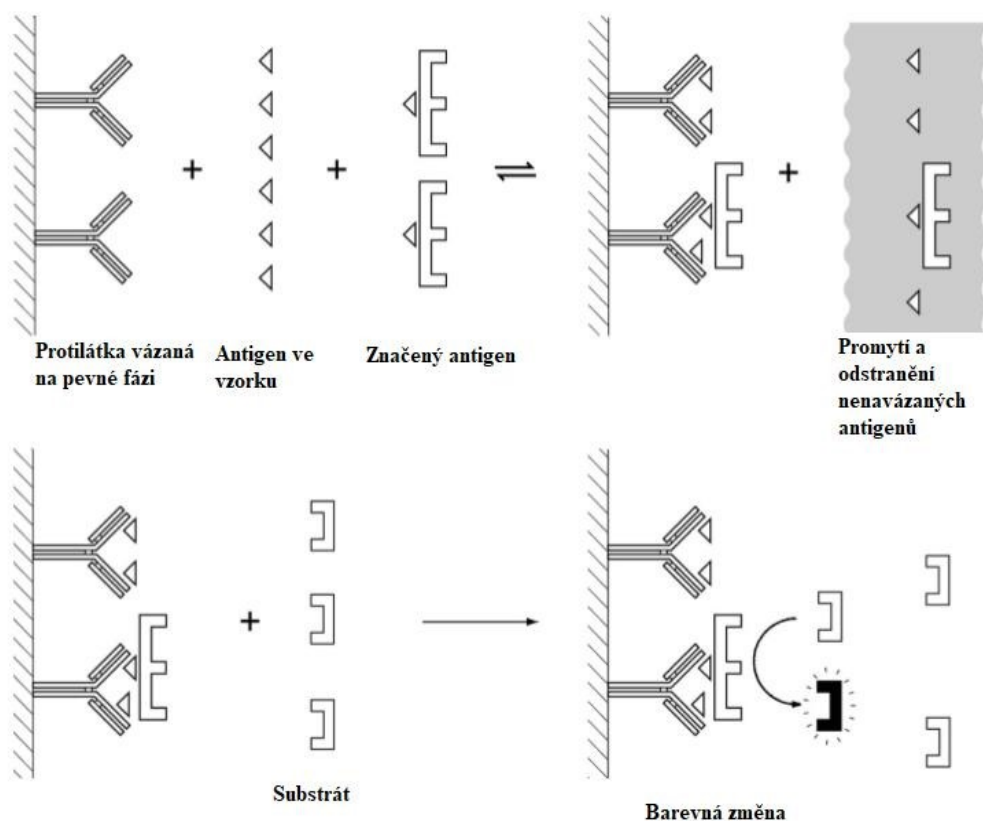
protilátkami. Metoda využívá uspořádání, kde na pevnou fázi může být navázána nejprve neznačená protilátka a v dalším kroku značený antigen nebo naopak (Crowther, 1995). **Nepřímá ELISA** je dvoustupňová metoda zahrnující proces vazby primární protilátky a značené sekundární protilátky. Primární protilátka je inkubována s antigenem zachyceným na pevnou fázi a po promytí je inkubován imunokomplex se sekundární značenou protilátkou, jak ukazuje obrázek 12. Tato metoda se využívá například k detekci antivirového IgG (Wild, *et al.*, 2013; Crowther, 1995).



Obrázek 12: Nepřímá ELISA – upraveno dle (Wild, *et al.*, 2013)

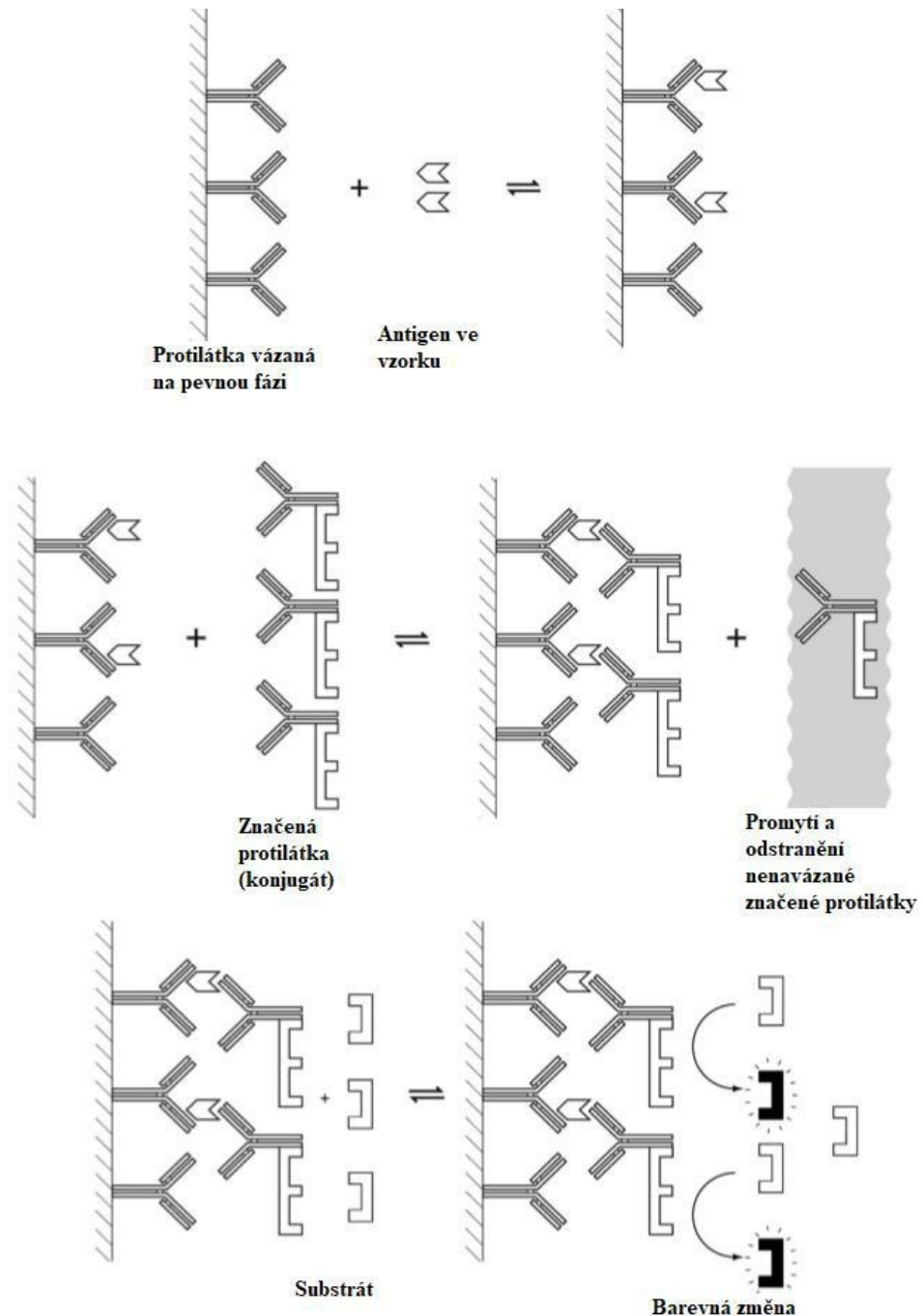
Kompetitivní ELISA využívá primární protilátku vázanou na pevnou fázi. Následně je do reakce přidán vzorek obsahující neznačený antigen a antigen značený enzymem, který je přidán ve větším množství než protilátka vázaná na nosič. Neznačený antigen a antigen značený enzymem soutěží o vazebná místa v poměru, v kterém jsou v reakci. Po inkubaci jsou vymyty nenavázané antigeny a po přidání substrátu detekujeme

barevnou změnu, která je nepřímou úměrnou koncentraci stanovovaného analytu viz. Obrázek 13 (Wild, *et al.*, 2013).



Obrázek 13: Kompetitivní ELISA – upraveno dle (Wild, *et al.*, 2013)

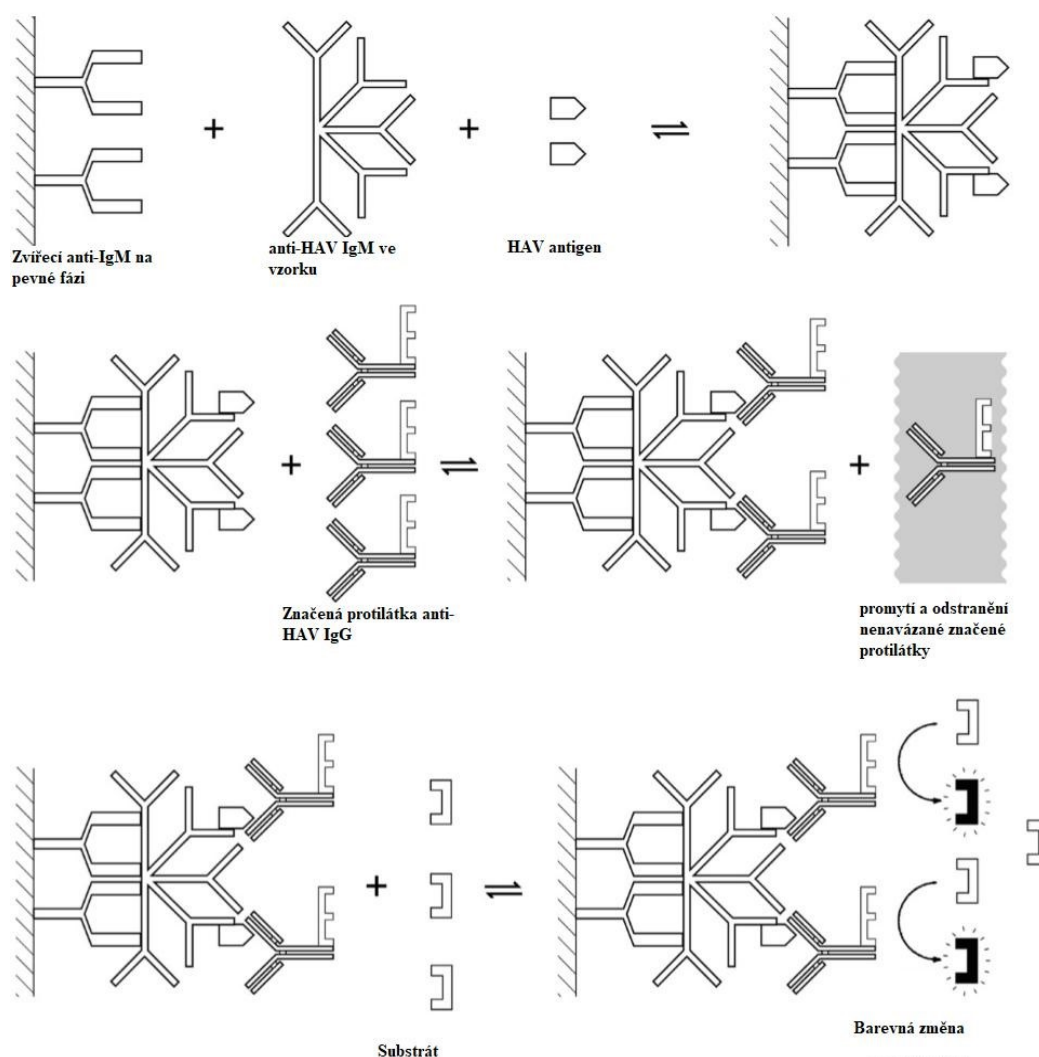
Sendvičová ELISA kvantifikuje antigeny mezi dvěma protilátkami (tj. zachycovací a detekční). Měřený antigen musí obsahovat alespoň dva antigenní epitopy schopné vázat se na protilátku, protože v této reakci působí alespoň dvě protilátky. Jako detekční nebo záchytné protilátky mohou být využity monoklonální i polyklonální protilátky. Monoklonální protilátky rozpoznávají jediný epitop, který umožňuje citlivou detekci a kvantifikaci malých rozdílů v antigenu. Polyklonální protilátka je často používána jako záchytná protilátka pro detekci co největšího množství antigenu. Výhodou sendvičového uspořádání je 2 – 5krát vyšší citlivost oproti přímému uspořádání. Optimalizace sendvičových postupů ELISA může být obtížná a měly by být použity testované párové protilátky. Díky tomu jsou protilátky schopny detekovat různé epitopy na cílovém proteinu, a je tím zabráněno interferenci s jinou protilátkou (viz. Obrázek 14). (Wild, *et al.*, 2013; SinoBiological, 2020).



Obrázek 14: Sendvičová ELISA – upraveno dle (Wild, *et al.*, 2013)

Sendvičová capture ELISA slouží k průkazu protilátek ve vzorku. Princip metody je založen na navázání antigenu či protilátky na pevném nosiči. Používá se například pro stanovení IgM protilátek (Burtis, *et al.*, 2012). Na destičce je vázána zvířecí protilátka, která se váže k IgM ve vzorku. Do reakce se přidává specifický antigen hepatitidy A (HAV). V posledním kroku se přidává značená protilátka anti-HAV IgG proti danému

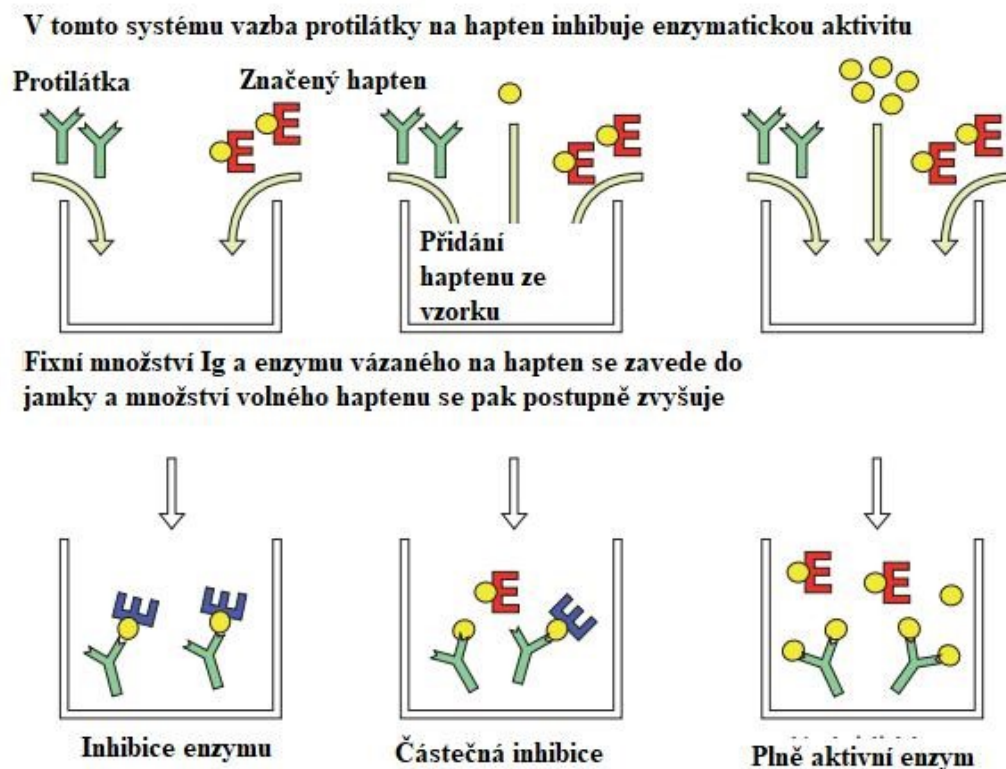
antigenu. Nenavázané protilátky jsou promyty a po přidání substrátu se detekuje barevná změna (viz. Obrázek 15) (Wild, *et al.*, 2013; Schneiderka, *et al.*, 2004).



Obrázek 15: Capture formát ELISY pro stanovení anti-HAV IgM – upraveno dle (Wild, *et al.*, 2013)

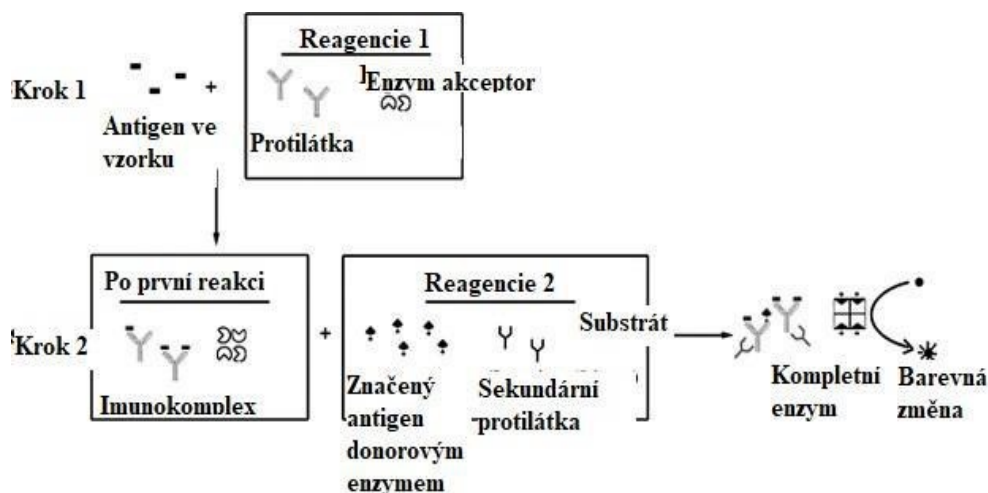
2. Homogenní metody

Enzymová multiplikovaná imunoanalýza (EMIT) je homogenní enzymová kompetitivní analýza využívající změny aktivity enzymu v imunokomplexu. Hapten ze vzorku soutěží o vazebné místo na protilátce s haptenu značeným enzymaticky. Po navázání značeného haptenu dojde k inaktivaci enzymu (viz. Obrázek 16). Koncentrace stanoveného haptenu odpovídá změně zabarvení po přidání substrátu (Daussant, *et al.*, 2007).



Obrázek 16: Kompetitivní EMIT – upraveno dle (Daussant, *et al.*, 2007)

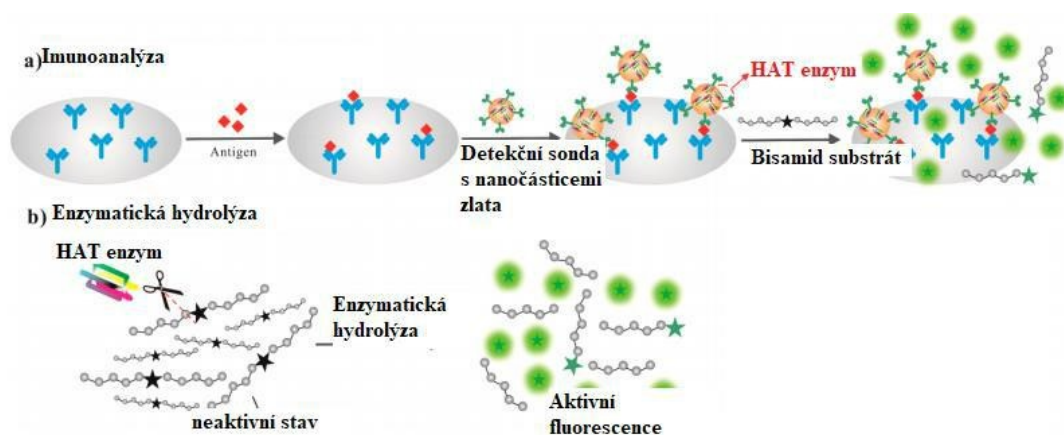
Klonovaný imunotest dárce enzymu (CEDIA) je homogenní imunoanalýza využívající technologii rekombinantní DNA. Umožňuje vysoce citlivou detekci analytů s nízkou molekulovou hmotností bez separačních kroků. Je založena na bakteriálním enzymu β -galaktosidáze, který byl geneticky rozdělen na dva neaktivní fragmenty, dárce enzymu (ED) a akceptor enzymu (EA). Komplementace ED a EA tvoří aktivní enzym. Kovalentní připojení analytu nebo ligandu k ED neovlivňuje schopnost EA a ED tvořit aktivní enzym. Analyt přítomný ve vzorku soutěží o vazbu na omezený počet míst protilátek, čímž je k dispozici konjugát ED – ligand pro tvorbu enzymu (viz. Obrázek 17). Množství vytvořeného enzymu je tedy přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku (Jeon, *et al.*, 2004).



Obrázek 17: Dvoukroková CEDIA homogenní imunoanalýza upraveno dle (Wild, *et al.*, 2013)

3. Další typy enzymových imunoanalytických metod

Fluorescenční ELISA (FELISA) je založena na lidském alfa-thrombinu (HAT), který je schopen spustit fluorescenční signál rozštěpením substrátu. V tomto systému jsou detekované protilátky a HAT označeny nanočásticemi zlata (AuNPs), což tvoří systém detekční sondy. Jako substrát HAT enzymu je použit bisamid. Po sendvičové imunoreakci může HAT katalyzovat štěpení substrátu za vzniku fluorescenčního signálu. Tato metoda byla použita např. k detekci velmi nízkých hladin AFP a HBsAg a dokáže detekovat 104krát nižší koncentrace než běžné fluorescenční testy a 106krát nižší koncentrace než běžné ELISA testy. (Obrázek 18) (Wu, *et al.*, 2017).

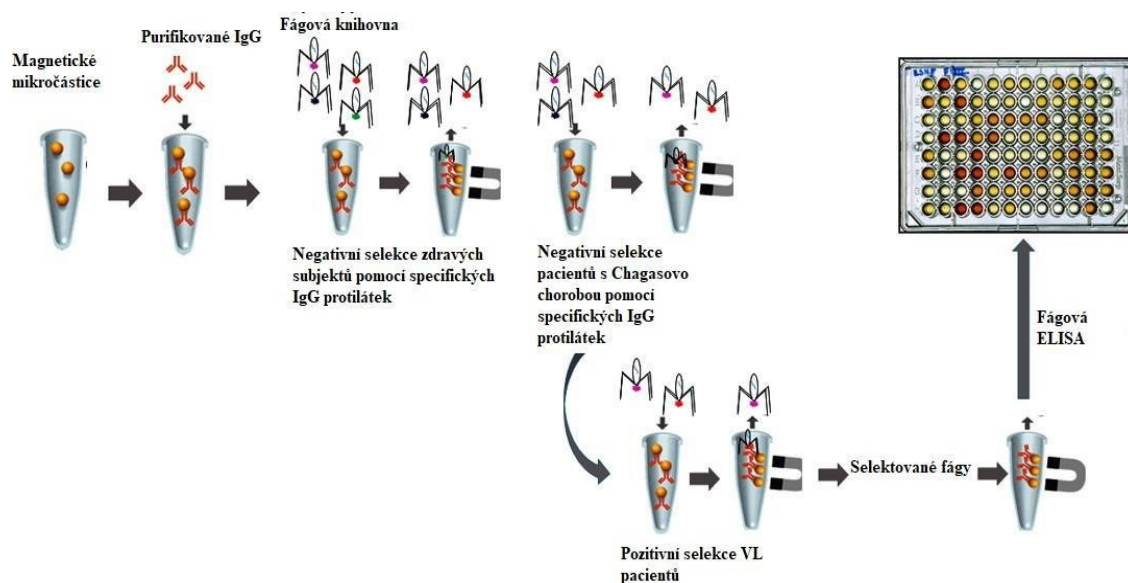


Obrázek 18: Schéma rozšířené metody FELISA pro detekci AFP a HBsAg – upraveno dle (Wu, *et al.*, 2017)

PCR ELISA (spojení polymerázové řetězové reakce s enzymoimunoanalýzou)

je jednoduchá a reprodukovatelná metoda. Po přímé extrakci izolované DNA z vlasů či nehtů je DNA amplifikována druhově specifickým primerem značeným dioxigeninem, který je přímo zaměřen na gen topoizomerázy II. Následně pomocí enzymové reakce se sondami značenými biotinem dojde ke specifické a citlivé identifikaci pěti nejběžnějších dermatofytů (Wiegand, *et al.*, 2017).

Fágová ELISA nachází uplatnění například v sérologii. V prvním kroku jsou izolovány fágové klony získané pozitivní selekcí za použití specifické protilátky IgG např. pro pacienty s viscerální leishmaniózou. Dále je princip metody založený na sandvičové imunoanalýze, kde je v mikrodestičkách navázána protilátka proti obalovému proteinu bakteriofágů M13. Po navázání vybraných fágů je přidána peroxidázou značená protilátka a následně je přidán substrát. Po ukončení reakce přidáním kyseliny sírové se měří intenzita barevné reakce, která odpovídá množství specificky vázané fágové částice (viz. obrázek 19). (Salles, *et al.*, 2016).



Obrázek 19: Fágová ELISA – upraveno dle (Salles, *et al.*, 2016)

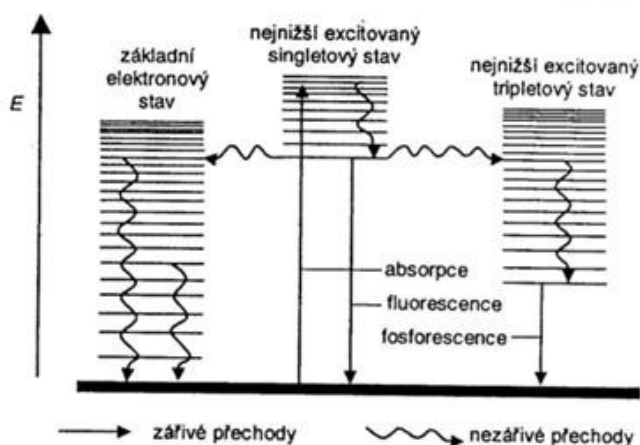
DAS-ELISA (dvouprotilátková ELISA) se využívá převážně u stanovení virů k určení jejich subtypů. Princip je stejný jako u standardní enzymové imunoanalýzy, ale DAS-ELISA je specifičtější. Po navázání antigenu na ukotvenou protilátku dojde k odhalení struktur daného epitopu, na které se váže druhá značená protilátka, čímž je zabráněno nespecifickým reakcím (Ming, *et al.*, 2019).

1.4.5.3. Neenzymové neizotopové metody

Neenzymové neizotopové metody jsou založeny na principu luminiscence, fluorescence a fosforescence.

Luminiscence je fyzikální jev, který se v přírodě vyskytuje jako bioluminiscence u některých organismů. Již starověké civilizace popisovaly a dokumentovaly luminiscenci u světlušky *Lampyrus noctiluca* využívající procesů odbourávání luciferinu enzymem luciferázou. Luminiscence vzniká vybuzením atomu luminoforu do excitovaného stavu (tj. energeticky bohatšího) a následným návratem atomu do základního stavu, při kterém dojde k vyzáření fotonů. Jedná-li se o interakci mezi ionizujícím zářením a hmotou, pak hovoříme o radioluminiscenci. Dochází-li k průchodu elektrického pole přes ionizovaný plyn, pak hovoříme o elektroluminiscenci, pochází-li luminiscence z chemické reakce, jedná se o chemiluminiscenci.

Fluorescence a fosforescence jsou založeny na excitaci atomů v základním elektronickém stavu. Po absorpci ultrafialového záření dochází k excitaci ze základního vibračního stavu do vyšších vibračních hladin singletového stavu, a tím do vyšší energetické hladiny. Následně atom ztrácí přebytek energie v důsledku kolizí s okolními atomy, vrací se na základní hladinu a emituje přebytečnou energii ve formě fotonů. Návrat z excitovaného singletového stavu se nazývá zářivý přechod neboli fluorescence. Pokud molekula přejde do excitovaného tripletového stavu, při kterém dochází k obrácení spinů, jedná se o fosforescenci. Princip fluorescence a fosforescence je popsán na obrázku 20.



Obrázek 20: Deexcitační mechanismy v molekule (Kouda, 2003)

Jak bylo popsáno výše, luminiscence, fluorescence a fosforescence vznikají na základě chemické reakce spojené s uvolněním signálů, které lze snadno kvantifikovat. Tyto procesy se nazývají chemiluminiscence a jsou v současné době nejrozšířenějším

principem detekce analytických metod (Lee, 2008; Guilbault, 1990). Fluorescence využívá proteiny kovalentně vázané s fluorescenčními činidly (fluorofory). Nejběžnějším fluoroforem je fluorescein-5-izothiokyanát. Fluorofory se využívají ke značení protilátek u imunochemických a mikroskopických metod, dále u metod pro kvantifikaci nukleových kyselin nebo v průtokové cytometrii (Bartůňková, *et al.*, 2011; Zima, 2013).

1.4.5.3.1. Fluorescenční metody (FIA)

Mikročásticová enzymová imunoanalýza (MEIA) je fluorescenční analýza v kompetitivním nebo nekompetitivním uspořádání vyvinutá firmou Abbott Diagnostics a používanou u analyzátoru Abbot IMx. Protilátky (antigeny) jsou navázány na mikročástice v kyvetě, následně jsou promíchány se vzorkem a po inkubaci dojde k separaci mikročástic pomocí skleněných vláken. Následně je přidán konjugát antigenu či protilátky značený alkalickou fosfatázou. Po inkubaci dojde k promytí přehřátým ředícím roztokem a přidá se substrát 4-methylumbelliferylfosfát, který je enzymem přeměněn na 4-methylumbelliferon, jenž je schopen emitovat záření o vlnové délce 448 nm (Wild, *et al.*, 2013).

Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA) je polarizační fluorescence. Jedná se o homogenní kompetitivní metodu bez potřeby separace. Fluorometr generuje polarizované světlo při 485 nm, což je excitační maximum pro fluorescein, a detekuje emitované světlo při 525-550 nm prostřednictvím vertikálního polarizačního filtru. Pokud je značený antigen navázán na protilátku za vzniku imunokomplexu, nedojde k polarizaci a měří se silný fluorescenční signál. Pokud se imunokomplex vytvoří, malá molekula se polarizuje a signál je slabý (Wild, *et al.*, 2013).

Disociačně vylepšený lanthanidový fluorescenční imunologický test (DELFI) je technologie, která využívá časově modulované detekce fluorescenčního signálu. To je možné díky lanthanidovému chelátu europia. Tento test je založený na pracovním postupu podobnému enzymové imunoanalýze, ale má širší dynamický rozsah a stabilnější signál, který lze měřit i několik let po původním stanovení, pokud jsou destičky správně skladovány. V imunotestu DELFIA je záchytná protilátka potažena na mikrodestičce. Přidá se vzorek a poté následuje řada promývacích kroků. Po první sérii promývání se do každé jamky přidá detekční protilátka značená europiem. Destička se promyje ještě

jednou a přidá se „zesilovací“ roztok“ obsahující luminogenní ligand v silně kyselém roztoku s přidavkem detergentního činidla. Vylepšené řešení uvolňuje europium z jeho chelátu, což umožňuje tvorbu nového, vysoce fluorescenčního chelátu v roztoku. Excitace při 320 nebo 340 nm vede k detekovatelné emisi při 615 nm. Množství analytu je úměrné emisnímu signálu. Časově rozlišená detekce minimalizuje detekci fluorescence interferujících látek v séru (PerkinElmer, 2007).

Časově rozlišená emise zesíleného kryptátu (TRACE) patří mezi další metody s časově modulovaným signálem. Využívá kryptáty vzácných zemin s iontem europia jako donorem a derivát alofykocyaninu. K excitaci dochází při 307 nm a k emisi při 550–720 nm. Princip je hodně využíván u multiplexových imunoanalýz (Wild, *et al.*, 2013).

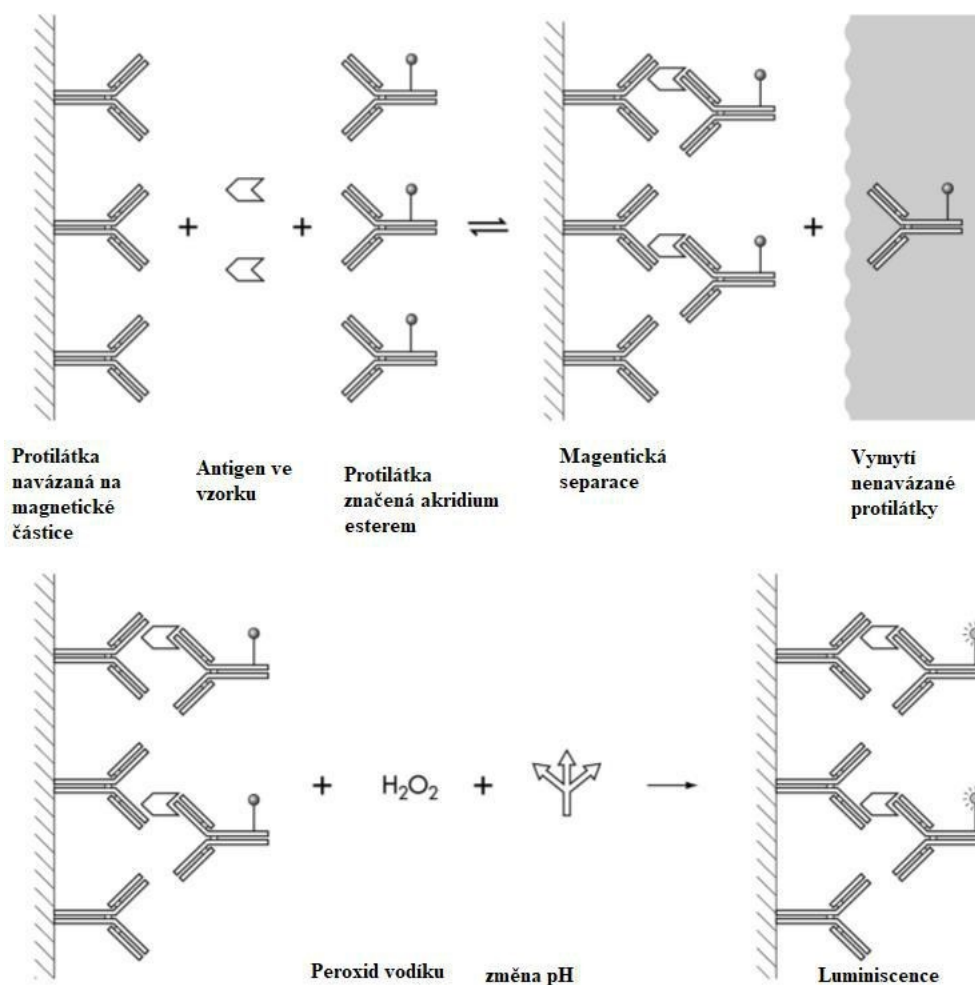
1.4.5.3.2. Chemiluminiscenční a elektrochemiluminiscenční metody

Chemiluminiscence je založena na principu reakce molekul, které jsou schopny absorbovat energii, díky níž se přesunou do vyšších energetických hladin (excitují). Při návratu molekul z excitovaného stavu do stavu základního je emitováno záření. Pro analytické účely se nejvíce používá emise viditelného světla. V chemiluminiscenčních reakcích jsou používány materiály emitující světlo a silná oxidační činidla (např. peroxid vodíku, manganistan, ozon, chlornan či kyanoželezitan atd.) (Vesna, *et al.*, 2008). Reakce mohou být navrženy na podobném principu, jak bylo popsáno výše, tzn. že formát metod může být sendvičový, kompetitivní, capture.

Luminoimunoanalýza (LIA) a imunoluminoanalýza (ILMA)

Luminoimunoanalýza (LIA) a imunoluminoanalýza (ILMA) jsou základní chemiluminiscenční metody založené na kompetitivním principu (LIA) a nekompetitivním principu (ILMA).

Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA) využívá jako luminofory látky, které jsou schopny produkovat světlo díky chemické reakci. Metody využívají polystyrenové kuličky nebo paramagnetické částice potažené antigenem či protilátkou za použití specifických substrátů (dioxoetan, akridinium ester) viz. Obrázek 21. Uspořádání může být sendvičové, kompetitivní i sendvičové (Wild, *et al.*, 2013).

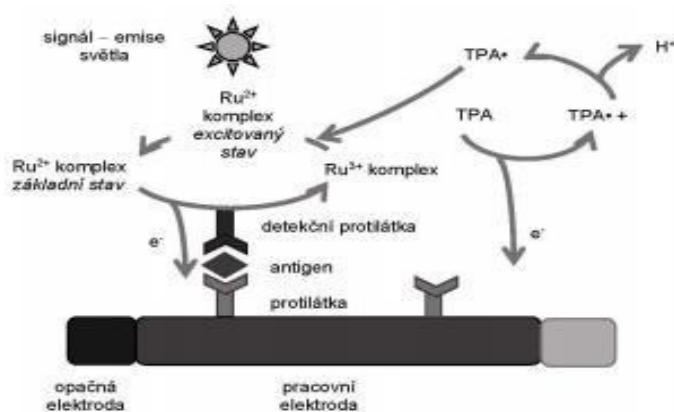


Obrázek 21: princip CLIA – upraveno dle (Wild, et al., 2013)

Luminiscence založena na přenosu kyslíku (LOCI) je homogenní sendvičová imunoanalýza probíhající na dvou latexových kuličkách. Na první kuličce s navázanou protilátkou proti stanovovanému antigenu je rozpuštěn olefin, který může reagovat se singletovým kyslíkem za vzniku nestabilního dioxetanu, který se spontánně rozkládá za současně vyzařovaného světla. Druhá kulička je potažená protilátkou proti jinému epitopu stanovovaného antigenu a obsahuje rozpuštěný ftalokyanin, který je po vystavení světlu schopen vybudit molekuly kyslíku do jejich singletového stavu. Pokud jsou k sobě kuličky spojeny přítomným antigenem, tak singletový kyslík difunduje do kuličky a iniciuje chemiluminiscenční reakci (vznik nestabilního dioxoetanu). Pokud nejsou kuličky navázány, protože antigen není přítomen, k reakci nedojde. Metoda produkuje až o 10⁴ fotony více než běžné chemiluminiscenční reakce (Wild, *et al.*, 2013)

Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích (CMIA) je metoda využívající chemiluminiscenční magnetické částice. Jedná se většinou o dvoustupňové reakce. Protilátka je navázaná na paramagnetické částice a jako konjugát slouží protilátka značená akridinovým derivátem. Použití tohoto formátu testu snižuje nespecifické reakce a minimalizuje Hookův efekt (Wild, *et al.*, 2013).

Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (ECLIA) je založena na sledu elektrochemicky iniciovaných chemických reakcí. Metoda je mimořádně citlivá. Systém obsahuje platinovou elektrodu s vázanou dvojmocnou solí ruthenia a sloučeninu tripropylaminu (TPA), která slouží jako substrát. Na magnetické polyesterové částice se vazbou streptavidin-biotin naváže stanovovaný antigen/protilátka. Po skončení inkubace jsou promyty mikročástice, které jsou zachyceny elektromagnetem. Poté se přidá substrát TPA a je vloženo napětí na elektrodu. Po vložení napětí se přemění dvojmocná sůl ruthenia na trojmocnou a zároveň je TPA oxidován na svůj radikál. Radikál následně redukuje trojmocnou sůl ruthenia na dvojmocnou. Velký rozdíl potenciálů způsobí přechod elektronů z TPA do základního stavu a vyzáření fotonu (luminiscence) (Roche, manuál analyzátoru Cobas e411, 2001). Příklad elektrochemiluminiscenční reakce je zobrazen na Obrázku 22.



Obrázek 22: Princip ECLIA (Fialová, *et al.*, 2020)

1.4.6. Další imunochemické metody

Specifické reakce mezi antigenem a protilátkou se využívají i u dalších metod jako je afinitní chromatografie, kde se nejprve naváže specifický antigen v koloně na protilátky navázané na nerozpustný nosič (imunosorbent) a následně se antigen z vazby uvolní

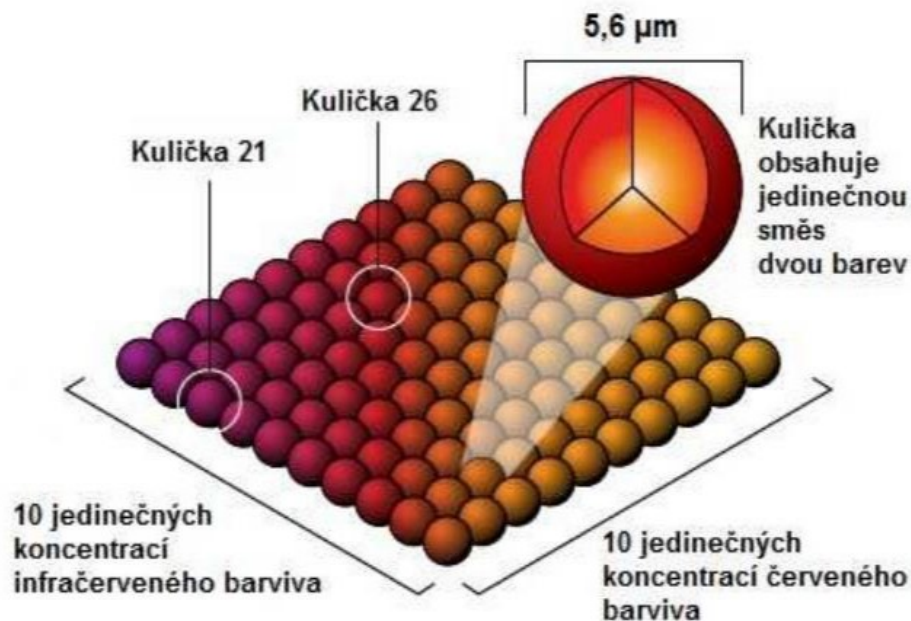
pomocí extrémního pH nebo vysokých koncentrací chaotropních látek. Dále jsou ve vývoji imunosenzory, které využívají vlastnosti, kdy se vazbou antigenu na imobilizovanou protilátku změní určité fyzikální vlastnosti, jež lze převést na měřitelný signál, a dále lze využít čipové senzory, které jsou multianalytové. Na takové senzory mohou být například naneseny různé druhy antigenů a provede se analýza velice podobná enzymové imunoanalýze, protilátky jsou značeny fluoroforem nebo peroxidázou a k vyhodnocení je použita speciální CCD kamera (Kodíček, *et al.*, 2006).

Afinitní chromatografie je separační metoda, při které se vzorek vnáší mezi 2 nemísitelné fáze – stacionární a mobilní. Díky pohybu mobilní fáze se vzorek skrze stacionární fázi pohybuje a interakcemi je stacionární fází zachytáván a opožděuje se vůči fázi mobilní. U afinitní chromatografie je stacionární fáze schopna vázat pouze určité části vzorku (např. antigen ve vzorku se váže na protilátku ve stacionární fázi) a dojde k separaci této dané složky, kterou můžeme i kvantifikovat na základě vyhodnocení chromatografu (Kouda, 2003). Afinitní chromatografie je moderní separační metoda spojující HPLC s bioafinitní chromatografií. Princip metody je založen na reverzibilní vazbě biologicky aktivní látky se specifickou strukturou (enzym-substrát; protilátka-antigen apod.). Interakce jsou zprostředkovány vodíkovými můstky, hydrofobními interakcemi i Londonovými disperzními silami či coulombickými interakcemi. Ligandy mohou vázat unikátní látku či látky se společnou vlastností a kinetika sorpce je pomalejší než např. u iontové výměnné chromatografie. Jelikož přírodní ligandy jsou poměrně drahé, je snaha vyrábět a používat ligandy syntetické. Nevýhodou syntetických ligandů je skupinová selektivita, a proto je snaha zlepšit selektivitu samotné separace. Stacionární fáze jsou připravovány vazbou ligandu na tuhý nosič a jejich separační schopnost závisí na velikosti částic, pórů, flexibilitě polymeru a samozřejmě matrice musí být teplotně, mechanicky, chemicky i pH stabilní. Jako stacionární fáze se používá např. silikagel, anorganické oxidy, agarozové nosiče a jejich deriváty polyakrylamidové gely, dextranové gely, celulóza atd. Mezi nové materiály patří tzv. technologie sol-gel umožňující vytvořit kapsule antigenů se zachováním jejich biologické aktivity. Dále je to tvorba vtištěných syntetických receptorů, které jsou velice stabilní a lze provádět eluci různými rozpouštědly, naopak nevýhodou je přítomnost nespecifických interakcí (Vařilová, 2005).

Fluorescenční imunochromatografie je podobná enzymové imunoanalýze s tím rozdílem, že imunochemická reakce probíhá na chromatografickém papíře během kapilární migrace. Vzorek je nanesen na podložku, přes kterou difunduje do nitrocelulózové membrány. Pokud je přítomen antigen, vzniká imunokomplex se zakotvenou protilátkou, která je značená fluoroforem, a následně je detekována fluorescence. Jako fluorofory byly použity např. částice obsahující Eu^{3+} , sulforhodamin B, nanokrystaly oxysulfidů potažené SiO_2 nebo polovodičové nanokrystaly (Štern, 2016).

FlowCytomix technologie je založena na sadě mikrokuliček o dvou velikostech. Každá sada kuliček je rozlišena různými intenzitami fluorescenčního barviva a na každé sadě je navázána specifická protilátka, druhá protilátka je značená fykoerytrinem. Měření probíhá na běžném průtokovém cytometru a tato metoda umožňuje stanovení až 20 různých analytů (Karlíková, *et al.*, 2013).

xMAP technologie využívá polystyrénové mikrokuličky o velikosti 5,6 μm , které jsou značeny 2 různými fluorescenčními barvivy s různou intenzitou. Pomocí odlišné intenzity barev pro mikrokuličky je možné použít až 100 xMAP barevně kódovaných sad mikrokuliček (viz obrázek 23). Na každém typu mikrokuličky je navázána specifická protilátka vázající analyt. Po smíchání mikrokuliček se sérem dochází k navázání analytů na specifické protilátky mikrokuliček. Ke směsi je následně přidána fluorescenčně značená protilátka. Následně je využita flow-cytometrie, kde procházejí jednotlivě mikrokuličky úzkou kapilárou a vstupují do detekční komůrky. Komůrkou procházejí 2 lasery. Červený laser o vlnové délce 635 nm, který detekuje intenzitu fluorescence mikrokuliček, a tím určuje typ analytu, a zelený laser o vlnové délce 532 nm, který je určen pro měření intenzity fluorescence na povrchu mikrokuliček (Karlíková, *et al.*, 2013).



Obrázek 23: xMAP technologie (Karlíková, *et al.*, 2013)

Planární mikroarraye – proteinové čipy se vyvinuly z technologií určených původně pro analýzu DNA. Protilátky nebo antigeny jsou nanášeny na povrch silikonových čipů nebo skleněných sklíček s nitrocelulózovou membránou. Každá oblast neboli spot obsahuje definovanou protilátku či antigen, jehož přesná pozice definuje typ analytu pro stanovení. Pro detekci a kvantifikaci sledovaných proteinů se využívá principů generujících kalorimetrický, radioaktivní, fluorescenční, chemiluminiscenční signál či enzymové reakce. Vyhodnocení se provádí pomocí speciálního softwaru (Karlíková, *et al.*, 2013).

Arraye na mikrotitračních destičkách jsou přímou modifikací ELISA technologie. Každá jamka destičky obsahuje až několik specifických protilátek, které vážou sledované proteiny ze vzorku na principu sendvičové reakce. Detekce je provedena chemiluminiscenčně či fluorescenčně dle výrobce. Produkce světla je následně detekována CCD kamerou (Karlíková, *et al.*, 2013).

Biosenzory a biočipy využívající imunochemické reakce. Zkoumání biologických organismů a schopnost rozpoznat cizí látky organismem pomocí bioreceptorů vedla vědce k vývoji nových analýz, které mají často vysokou selektivitu biologického rozpoznávání. Biologické rozpoznávání společně s dalšími metodami pomohly vytvořit rychle

se rozvíjející obor bioanalýzy se souvisejícími technologiemi známými jako biosenzory a biočipy. Biosenzor můžeme definovat jako zařízení, které se skládá z bioreceptoru a převodníku. Interakce analytu s bioreceptorem vyvolává signál, který je převodníkem převeden na elektrický signál, jenž můžeme detekovat. Pokud jsou tyto převodníky založené na integrovaných obvodech mikročipů, označujeme tyto biosenzory jako biočipy. Obecně platí, že biočip se skládá z řady biosenzorů, které lze jednotlivě monitorovat, a používají se pro analýzu více analytů. Nejběžnější typy biosenzorů jsou založeny na interakci antigen-protilátka, interakci nukleových kyselin, enzymatických reakcích, či buněčných interakcích, a převodníky jsou zpravidla založeny na principech optického měření (luminiscence, absorpce), elektrochemie či hmotnostně citlivých měřeních (mikrováha, akustická vlna) (Vo-Dinh, *et al.*, 2000).

V posledních desetiletích se postupy v imunochemii rozšířily a v nových aplikacích byly spojeny výhody některých postupů. Fluorescenční imunochromatografie spojuje výhody chromatografických a imunotechnických technik. Provedení imunoreakce trvá 15 min a fluorescence se sleduje po 10 minutách, což umožňuje velmi rychle získat přesné a spolehlivé výsledky. Kombinace hmotnostní spektroskopie a imunochemických metod snižuje nežádoucí vliv matricových efektů a přítomných autoprotilátek a zvyšuje spolehlivost metod. Využití senzorů obřího elektrického odporu magnetického pole umožňuje stanovení jednoho analytu ve velmi nízkých koncentracích (až fmol/L) bez nutnosti promývání (Štern, 2016).

1.5. Charakteristiky imunochemických metod

1.5.1. Základní charakteristiky

Jak již bylo uvedeno výše, imunochemické metody jsou dostatečně citlivé a přesné (detekční limity řádově dosahují hodnot 10^{-15} až 10^{-20} mol/L), což umožňuje jejich využití pro rutinní analýzy látek s velmi nízkou koncentrací. Jejich výhodou je dostatečná specifita umožňující přímé stanovení v biologickém materiálu bez nutnosti preanalytické úpravy vzorku. Jedná se o metody dostatečně přesné s konzistentními výsledky. Úroveň standardizace a zajištění návaznosti je v současné době postupně zvyšována zaváděním mezinárodně uznávaných referenčních materiálů s dostatečnou komutabilitou.

1.5.2. Interference

Interference imunochemických metod představují problém, který lze minimalizovat podrobným nastudováním přesných struktur stanovovaných molekul a metod používaných ke stanovení. Tyto interference mohou ovlivnit imunochemické stanovení a následně výsledek analýzy. Jsou popisovány 4 hlavní typy interferencí:

1) Zkřížená reaktivita strukturálně podobných molekul, které mohou způsobit zkřížené reakce při stanovování hledaného markeru, což má za následek falešnou pozitivitu či negativitu stanovení. Zkříženou reaktivitu lze eliminovat použitím monoklonálních protilátek. Informace o zkřížených reakcích by měly být součástí dokumentace výrobců diagnostických souprav. (Zima, 2013).

2) Hookův efekt je jev, kdy při velmi vysokých koncentracích analytu dochází k omezení vazby antigen-protilátka, což vede k falešnému snížení signálu. U sendvičových testů dojde kvůli vysoké koncentraci analytů k saturaci záchytné i detekční protilátky. Tím se zabrání tvorbě detekovatelných imunokomplexů. Hookův efekt ovlivňuje hlavně metody na pevné fázi, kde je v reakci omezené množství záchytných protilátek a koncentrace analytu (např. stanovení nádorových biomarkerů). Jednou z možností, jak se vyvarovat případného Hookovu efektu je využívání metod s širokým pracovním rozsahem. V případě, že koncentrace analytu je mimo pracovní rozsah, je nutno vzorek adekvátně naředit a analýzu opakovat (Wild, *et al.*, 2013)

3) Interference heterofilních a lidských anti-myších protilátek (HAMA).

Heterofilní lidské protilátky jsou endogenní protilátky, které reagují s odlišnými imunoglobuliny používanými v diagnostických soupravách. Lidské anti-myší protilátky specificky reagují s epitopy myších imunoglobulinů a v krvi se objevují při reakci organismu na myší bílkoviny (podání imunoglobulinů za účelem terapie či styk s hlodavci). Mechanismus interference heterofilních či HAMA protilátek spočívá v přemostění vazebného místa pro ligand, a protilátka pak způsobuje pozitivní interferenci. Heterofilní či HAMA protilátka pak přednostně vychytává antigen ještě před jeho vazbou na primární nenavázanou protilátku (Zima, 2013).

4) Biotin

Biotin (vitamín B7) je hydrofilní sloučenina působící jako koenzym karboxylačních reakcí. Biotin je běžně dostupný v mnoha potravinách a doplňcích stravy a jeho doporučeného denního příjmu (přibližně 30 µg denně) lze snadno dosáhnout. Mechanismus interference biotinu se liší v závislosti na formátu testu. U sendvičového

formátu testu, který využívá k detekci vazbu biotin-streptavidin (např. některé testy na stanovení TSH), může nadbytek biotinu ve vzorku vytěsnit biotinylované protilátky, což vede k falešně nízkým výsledkům. Naproti tomu u kompetitivních imunoanalytických testů, např. u některých testů FT4, může nadbytek biotinu ve vzorku soutěžit s biotinylovanými analogy o vazebná místa na streptavidinu, což vede k falešné pozitivitě. (Avery, 2018). Falešná negativita, či pozitivita testu pak může vést k nesprávné identifikaci výsledku a následně ke špatné klinické interpretaci (Colon, *et al.*, 2018).

1.6. Imunochemické metody a biomarkery

Imunochemické stanovení analytů o nízké koncentraci v biologickém materiálu, imunoanalýza (imunoesej), dnes patří k rutinním a široce používaným technikám laboratorní medicíny. Jak již bylo řečeno dříve, imunochemické metody je možno díky svým výše uvedeným vlastnostem (detekční limit, snadná automatizace, dostatečná citlivost) použít k analýze biomarkerů závažných onemocnění. V následujících kapitolách bude pojednáno o biomarkerech nádorových onemocnění (karcinom prostaty, primární hyperparatyreóza) a degenerativních onemocnění (artróza kolene).

1.6.1. Biomarkery a jejich vlastnosti

Biomarkery jsou indikátory normálního či patologického procesu. Každý marker má určité charakteristické vlastnosti, které je opravňují k využití pro screening onemocnění, diagnostiku, monitoring, prognózu (Jabor, *et al.*, 2013). Chceme-li biomarkery využít např. k diagnostice nádorových onemocnění, měly by splňovat následující vlastnosti:

- Měly by být produkovány pouze u maligních onemocnění
- Měly by s dostatečnou citlivostí rozlišit zdravé od nemocných
- Měly by být orgánově specifické, snadno kvantifikovatelné
- Měly by korelovat s velikostí nádoru, závažností onemocnění, s prognózou a účinností terapie, být schopné stratifikovat riziko vzniku onemocnění

V současné době neexistuje žádný univerzální biomarker, který by všechny tyto požadavky splňoval, je nutné vždy k diagnostice využít multimarkerový přístup zahrnující využití více biomarkerů. (Kaušitz, *et al.*, 2014).

1.6.2. Klasifikace biomarkerů dle složení

1) DNA biomarkery

DNA biomarkery mohou být využity k diagnostice různých typů nádorových onemocnění, ale také dalších onemocnění jako je sepse či autoimunitní onemocnění. Mutace v onkogenech, tumor supresorových genech a bodové mutace mohou být rozpoznány pomocí DNA biomarkerů (DNA sond odpovídající hledané mutaci).

2) RNA biomarkery

Většina biomarkerů na bázi RNA, které procházejí klinickým hodnocením, se skládá z multigenových molekulárních vzorů nebo „otisků prstů“. Stanovení těchto markerů může být velmi přesné a citlivé, k vyhodnocení charakteristik je nutné využít biostatistické a bioinformatické přístupy.

3) Proteinové biomarkery

Proteinové biomarkery se v laboratorní diagnostice používají nejčastěji. Jsou to zejména enzymy, hormony, strukturní proteiny či signální molekuly. Stanovují se nejen koncentrace a aktivity enzymů ve vztahu k funkci cílové tkáně, ale identifikují se také například posttranslační modifikace (fosforylace, glykosylace) (Kumar, *et al.*, 2009).

1.6.3. *Klasifikace biomarkerů dle použití*

Klasifikaci biomarkerů dle použití shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2: Klasifikace biomarkerů dle použití

Odhad rizika	Jedná se o kvalitativní či kvantitativní hodnocení rizika pro lidské zdraví na základě dané charakteristiky (hodnoty biomarkeru).
Screening	Screening slouží k rozlišení zdravých, nemocných i asymptomaticky nemocných pomocí jednoho či více biomarkerů. Biomarkery by u screeningu měly zajistit včasnou diagnostiku onemocnění.
Diagnostika	Biomarkery lze využít k potvrzení diagnózy na základě laboratorního výsledku např. HCG v těhotenství.
Staging	Hodnota biomarkeru může pomoci posoudit rozsah onemocnění. Jako příklad můžeme uvést velikost nádoru.
Prognóza	Biomarkery lze uplatnit nejčastěji u nádorových onemocnění k posouzení prognózy a případně i k výběru léčby.
Sledování průběhu choroby	Biomarkery lze využít pro hodnocení remise a případného relapsu onemocnění.
Účinek terapie	Detekce účinnosti léčby, využití biomarkerů nám umožňuje včas změnit typ léčby, hladinu samotného léku.
Frekvence vyšetření	Sledování biomarkerů se provádí na základě jejich biologického poločasu či dle doporučení frekvence vyšetření dle WHO.

Vytvořeno dle (Valík, *et al.*, 2014; Kumar, *et al.*, 2009).

1.7. Biomarkery nádorových onemocnění

Jak již bylo zmíněno v úvodu, práce je zaměřena na využití imunoanalytických metod v diagnostice nádorových onemocnění, konkrétně ke stanovení biomarkerů karcinomu prostaty a primární hyperparatyreózy.

1.7.1. *Nádorové biomarkery karcinomu prostaty*

Karcinom prostaty patří mezi nejčastější diagnostikované malignity. Jedná se o druhou nejčastější příčinu úmrtí na nádorová onemocnění. Rostoucí incidence

souvisí i se zvyšujícím se věkem mužů. Včasná diagnostika je důležitá pro efektivní terapii (Klečka, *et al.*, 2008). I přes snahu vyhledat pacienty s onemocněním v léčitelném stavu se u mnoha nemocných zjistí pokročilý či metastazující karcinom, jenž ohrožuje zdraví a život nemocného. Nárůst výskytu karcinomu prostaty vede ke snaze zefektivnění screeningu. (Kaplan, *et al.*, 2010)

Nejvíce používaným markerem v současné laboratorní diagnostice je prostatický specifický antigen (PSA), který má ale nízkou senzitivitu a vysokou biologickou variabilitu. Na základě pozitivního screeningu je potřeba potvrdit karcinom pomocí invazivního vyšetření biopsie (Kaplan, *et al.*, 2010). Jelikož ložiska případného karcinomu prostaty nejsou na ultrazvuku patrná, je potřeba provést systematický odběr 10–12 vzorků z různých míst tkáně. I přes tento systematický odběr nemusí dojít ke kompletnímu vyjmutí nádorové tkáně, dále může být proveden pouze záchyt v méně agresivní oblasti či v oblasti klinicky insignifikantního onemocnění. Biopsie je dále zatížena rizikem infekce či krvácením pacienta a jeho následným diskomfortem (Stejskal, *et al.*, 2018).

1.7.1.1. Přehled diagnosticky významných biomarkerů karcinomu prostaty

Prostatický specifický antigen (PSA) a volný PSA (fPSA)

PSA je glykoprotein (lidský kalikrein), jedná se o orgánově specifický antigen (Kopecký, *et al.*, 2015). PSA je serinová proteáza vylučovaná epiteliálními buňkami acinů a ductů prostaty. Za fyziologických podmínek se do séra vylučuje jen v nepatrných koncentracích a vytváří zde komplexy s alfa-2-makroglobulinem nebo alfa-1-antichymotrypsinem. Asi 10–50 % PSA se nachází v séru v nenavázané formě tzv. volného PSA. V současné době se jedná o nejrozšířenější biomarker využívaný ke sledování vývoje a účinnosti léčby u pacientů s karcinomem prostaty (Klečka, *et al.*, 2008).

Zavedení screeningu karcinomu prostaty prostřednictvím vyšetření koncentrací PSA v séru vedlo nejen k časně identifikaci onemocnění, ale i ke snížení úmrtnosti pacientů. I přes tyto nesporné výhody jsou publikovány zvýšené koncentrace PSA u nenádorových onemocnění, například u benigní hyperplázie prostaty či prostatitidy (Kaplan, *et al.*, 2010).

Je publikována referenční cut-off hladina PSA = 4,0 µg/L (referenční cut-off se mění v závislosti na věku; do 50 let = 2,5 µg/L, do 60 let = 3,5 µg/L,

do 70 let = 4,5 µg/L, starší = 6,5 µg/L Frakce fPSA/PSA bývá u maligního nádoru 0 – 15 %, hraniční hodnoty jsou 15 – 20%, u benigního onemocnění nad 20 %.) je spojena s 25% rizikem karcinomu prostaty, hladina 10 µg/L již představuje riziko větší než 50 % (Kopecký, *et al.*, 2015).

Jsou publikována data ukazující, že asi u 20 % pacientů, kteří mají hodnoty PSA < 4,0 µg/L, jsou diagnostikovány agresivní typy karcinomu, a tito pacienti tedy nemusí být správně diagnostikováni. V oblasti 4–10 µg/L je problémem nízká specifita PSA (Kaplan, *et al.*, 2010). Přesto jsou u pacientů s pokročilým stadiem onemocnění popisovány koncentrace PSA v rozmezí 2–9 µg/L (Bickers, *et al.*, 2009). Všechny tyto zmiňované okolnosti ukazují na potřebu hledání dalších doplňkových či nových biomarkerů. Z diagnostického hlediska je zajímavé také vyšetřovat hladiny i senzitivního PSA (tzv. PSA 3. generace) je využíváno ke sledování vývoje a účinnosti léčby pacientů po prostatektomii.

Volný prostatický specifický antigen (fPSA)

Poměr volného (fPSA) a celkového PSA se využívá pro odlišení benigní hyperplasie od karcinomu (u benigních hyperplasií je vyšší než 20 %). Tento poměr je automaticky stanoven pouze v případě, že jsou ošetřujícím lékařem požadována obě vyšetření (PSA a fPSA).

Poměr fPSA/PSA

Snaha o zlepšení senzitivity a specifity screningu karcinomu prostaty vedla k hledání dalších ukazatelů, mezi nimiž našlo největší uplatnění hodnocení podílu (fPSA/PSA*100). Bylo prokázáno, že pacienti s podílem fPSA/PSA nad 20–25 % mají nižší riziko nálezu karcinomu prostaty při biopsii. Ovšem ani tento marker neumožnil překonat zásadní nedostatek, kterým je rozlišení nádoru od benigních nálezů, především při nízkých hladinách markerů. Je zároveň důležité mít na paměti, že činnosti jako jízda na kole, vyšetření *per rectum* apod. zvyšují volné frakce PSA a poměr díky tomu může být falešně negativní (Kaplan, *et al.*, 2010).

-[2]proPSA, Index zdravé prostaty (PHI)

ProPSA je neaktivní prekursor PSA obsahující 7 aminokyselin na hlavním peptidu, který může být asociován s karcinomem prostaty, a naopak nepředpokládá se výskyt u pacientů s benigní hyperplazií prostaty. Formy proPSA obsahují zkrácené

sekvence o 2,4, nebo 5 aminokyselin. Firma Beckman Coulter zavedla stanovení [-2]pro PSA a kombinaci použití tPSA, fPSA a [-2]pro PSA pro použití výpočtu Indexu zdravé prostaty ($PHI = ([-2]proPSA/fPSA) \times \sqrt{tPSA}$). Je známo, že proPSA může odhalit karcinom v časném stadiu. U [-2]pro PSA se předpokládá spojitost s agresivnější formou nádoru (Tosoian, *et al.*, 2012). Byly stanoveny hodnoty indexu zdravé prostaty (PHI) pro benigní hyperplazii prostaty 0-30, v rozmezí 30-40 se jedná o hraniční zónu a hodnoty > 40 jsou charakteristické pro karcinom prostaty. Současné studie ukazují, že výpočet poměru [-2]proPSA a PHI by mohl zvýšit četnost zachytu karcinomu prostaty a redukovat počet nadbytečných biopsií. Z přehledových studií vyplývá, že PHI index má nejvyšší specifitu ve srovnání s ostatními markery. Zvýšení PHI zároveň zvyšuje 4,7krát pravděpodobnost rakoviny prostaty a je spojováno s větším rizikem závažných komplikací u pacientů se závažným průběhem onemocnění (pacienti s Gleasonovým skóre 7 nebo vyšším). Předpokládá se vyšší specifita na hladinách 2,5 – 4,0 ng/L, kde je poměr fPSA/tPSA málo specifický. (Kopecký, *et al.*, 2015).

1.7.1.2. Některé nově využívané biomarkery karcinomu prostaty

V současnosti je diskutováno velké množství markerů, u kterých je popisován jistý diagnostický význam pro léčbu karcinomu prostaty. V následující části textu je pojednáno o vybraných biomarkerech, které jsou předmětem zájmu předkládané dizertační práce.

Chromogranin A

Chromogranin A je glykoprotein, který je exprimován neuroendokrinními buňkami. Byla prokázána jeho zvýšená exprese u neuroendokrinních nádorů (Niedworok *et al.*, 2017). Neuroendokrinní nebo malobuněčná varianta karcinomu prostaty je charakteristická svojí agresivitou a rezistencí vůči antiandrogenním terapiím. Tato forma karcinomu prostaty je spojována se špatnou prognózou (Szarvas, *et al.*, 2020).

Endoglin 2

Podílí se na modulaci buněčné adheze a motility různých typů buněk, včetně prostaty. Endoglin je primárně exprimován v proliferujících vaskulárních endoteliálních buňkách a buňkách hladkého svalstva a je vysoce exprimován na endotelových buňkách během nádorové angiogeneze. Endoglin je exprimován v mikrovaskulatuře prostaty. Jsou dokumentovány zvýšené sérové koncentrace u pacientů s metastázami kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu a plic. Ukazuje se, že endoglin má nezávislou prognostickou

hodnotu jako sérový indikátor metastáz rakoviny prostaty do pánevních lymfatických uzlin a biochemické recidivy po prostatektomii. Bylo prokázáno, že exprese endoglinu se u karcinomu prostaty mění a vysoké hladiny endoglinu jsou spojeny se sníženým přežitím u pacientů s hodnotami Gleasonova skóre mezi 6 - 7, u kterých endoglin koreluje s mírou migrace invazivity tumoru (Romero, *et al.*, 2011).

Annexin

Annexin je na vápníku závislý protein vázající fosfolipidy s různou buněčnou funkcí. Annexin za fyziologických podmínek chybí v prostatě, ale je exprimován v epitelu prostaty u dobře až středně diferencovaných nádorů. Je také vysoce exprimován u špatně diferencovaných nádorů (Shyh-Han, *et al.*, 2021). Annexiny se podílejí na regulaci transportu v membránách, buněčné adhezi a možné genogenezi (Wei, *et al.*, 2003).

Tkáňový inhibitor metaloproteináz (TIMP-1)

TIMP-1 je inhibitorem matrixové metaloproteinázy 9 (MMP9). MMP-9 štěpí kolagen IV a želatinu, které jsou hlavními stavebními prvky bazální membrány. Degradace bazální membrány je nezbytná pro invazi tumoru a rozvoj metastáz. Rovnováha mezi metaloproteinázami a jejich inhibitory může vést k větší degradační aktivitě a vyšší invazivitě nádorových buněk (Reis, *et al.*, 2015). Několik studií prokázalo, že může také podporovat progresi nádorů prostřednictvím stimulace růstu nádorových buněk a zároveň může inhibovat jejich apoptozu. U myších modelů byla prokázána schopnost TIMP-1 podporovat progresi rakoviny indukováním akumulace fibroblastů spojených s rakovinou prostaty. Jsou známy klinické studie prokazující zvýšené hladiny TIMP-1 v nádorových tkáních včetně karcinomu prostaty (Gong, *et al.*, 2015).

Serin proteázový inhibitor Kazal-type 1 (SPINK-1)

SPINK-1 je známý jako inhibitor trypsinu asociovaný s nádorem (TATI) nebo inhibitor pankreatické sekrece trypsinu (PSTI) Byl objeven v moči pacientek s karcinomem vaječníků. Za normálních fyziologických podmínek SPINK1 inhibuje předčasnou aktivaci pankreatických proteáz. SPINK1 působí jako autokrinní/parakrinní faktor a zprostředkovává onkogenní vlastnosti prostřednictvím downstream signalizace EGFR (Tiwari, *et al.*, 2020). Byla popsána nadměrná exprese SPINK1 u pacientů s karcinomem prostaty ve srovnání s benigní hyperplázií (Tomlins, 2008).

Thymidinkináza (TK1, TK210)

TK1 je enzym patřící do skupiny fosfotransferáz. V savčích buňkách jsou tvořeny dva izoenzymy, TK1 a TK2, které jsou kódovány dvěma lidskými geny. První forma TK1 je lokalizována na chromozomu 17q25.3, nachází se v cytoplazmě buněk a je závislá na buněčném cyklu. Druhá forma TK2 je mitochondriální, která je lokalizována na chromozomu 16q21 a je na buněčném cyklu nezávislá. TK1 je často spojována jako diagnostický biomarker různých typů maligních nádorů (žaludku, ovárií, děložního čípku, jícnu, plic, prostaty, prsu), protože se jedná o biomarker proliferace, jelikož je zapojen do biosyntézy DNA (Hanousková, *et al.*, 2020).

Nová alternativa stanovení TK1 je stanovení epitopu TK210. V séru existuje několik forem TK1 s různými molekulovými hmotnostmi a enzymovými aktivitami, což vede k potenciálnímu podhodnocení enzymové aktivity TK1. Také velká část sérové TK1 u subjektů se solidními nádory byla enzymaticky deaktivována a nalezena jako multimerní agregáty. Všechny formy TK1 však exprimují epitop TK210. Nová metoda využívá monoklonální protilátky specifické pro epitop TK210. TK210 ELISA dle výrobce zlepšuje citlivost a specifitu stanovení (Jagarlamudi, *et al.*, 2019).

Spondin-2 (Mindin, M-spondin)

Spondin-2 je protein spadající do rodiny F-spondinů, které jsou sekretovány extracelulární matrix. Členové této rodiny mají 3 domény. FS1 pro F-spondin, FS2 a trombospondin. Spondin-2 (Mindin, M-spondin) je lokalizován na chromozómu 4p16.3 a má několik biologických funkcí, mezi které patří spouštění imunitní odpovědi (Jin, *et al.*, 2017). Regulace mindinu je zprostředkována expresí EGR-1. Vztah mezi expresí EGR-1 a karcinomem prostaty byla dříve zmíněna ve studii Greggové *et al.*, kteří prokázali, že EGR-1 je downregulován u pacientů s klinicky prokázaným karcinomem prostaty dle klasifikace TNM (u 18 z 20 pacientů s pT2 a pT3 byla normální nebo snížená exprese EGR-1) (Gregg, *et al.*, 2010).

1.7.2. Biomarkery primární hyperparatyreózy a kalciofosfátového metabolismu

Primární hyperparatyreóza je endokrinní porucha dysregulace homeostázy vápníku. Vyskytuje se třikrát častěji u žen než u mužů. Pacienti často trpí nevolností, bolestí hlavy, zvracením, únavou, depresi, nefrolitiázou, pankreatitidou. Symptomatická forma je dále spojována se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem.

Onemocnění je často doprovázeno benigním adenomem příštítných tělísek až v 80–85 % případů a s hyperplazií příštítných tělísek v 10–15 % případů. Nejrelevantnější informace o aktivitě příštítných tělísek poskytují dlouhodobě zvýšené koncentrace PTH. Zvýšené koncentrace PTH jsou spojeny s hyperkalcémií a hypofosfatémií. (Zhu, *et al.*, 2020; Zajíčková, 2017). PTH stimuluje kostní obrat, zpětnou resorpci vápníku v ledvinách, aktivuje renální 1- α -hydroxylázu, a tak přes vitamin D zvyšuje resorpci vápníku v tenkém střevě. Dlouhodobě zvýšené vylučování PTH vede ke generalizované poruše kalciofosfátového metabolismu. Jako definitivní léčba je pacientům se symptomatickým onemocněním indikována paratyreoidektomie (Madeo, *et al.*, 2020).

Parathormon (PTH)

PTH je polypeptid podílející se na regulaci metabolismu kostí a minerálů, konkrétně vápníku a fosfátů. Syntéza a štěpení prekurzoru PTH probíhá v příštítných tělískách. PTH je syntetizován ve formě neaktivního prekurzoru Pre-proPTH. Pre-proPTH obsahující 115 aminokyselin je nejprve štěpen na proPTH obsahující 90 aminokyselin, který je následně velmi rychle (uvádí se doba kratší než 1 hodinu) štěpen na aktivní formu PTH s 84 aminokyselinami. Aktivní PTH je následně uložen v sekrečních granulích uvnitř příštítných tělísek. Jeho regulace je závislá na koncentraci extracelulárního vápenatého iontu. Po uvolnění ze sekrečních granulí je PTH rychle eliminován z krevního oběhu ledvinami a játry, regulace eliminace probíhá na úrovni genové exprese (Jacquillet, *et al.*, 2019). Vyšetření PTH je využíváno ke sledování vývoje primární i sekundární hyperparatyreózy. Díky krátkému biologickému poločasu (přibližně 2–5 minut) je možné využít sledování změn koncentrací PTH k posouzení úspěšnosti paratyreoidektomie (Tommasi *et al.*, 1995). Bylo popsáno několik různých protokolů pro intraoperační měření PTH, všechny s cílem pomoci chirurgovi činit aktivní a informovaná rozhodnutí během paratyreoidektomie. Úspěšná paratyreoidektomie je důležitá, protože případné reoperace jsou spojovány s významně vyšší morbiditou, včetně zvýšeného rizika opakovaného poranění hrtanového nervu (Mak, *et al.*, 2020).

Vápník

Vápník (kalcium) patří k nejvýznamnějším extracelulárním iontům. Zprostředkovává účinek hormonů, humorálních látek, cytokinů a dalších mediátorů na metabolismus buňky. Kalcium vytváří strukturu kostí a zubů, podílí se na regulaci

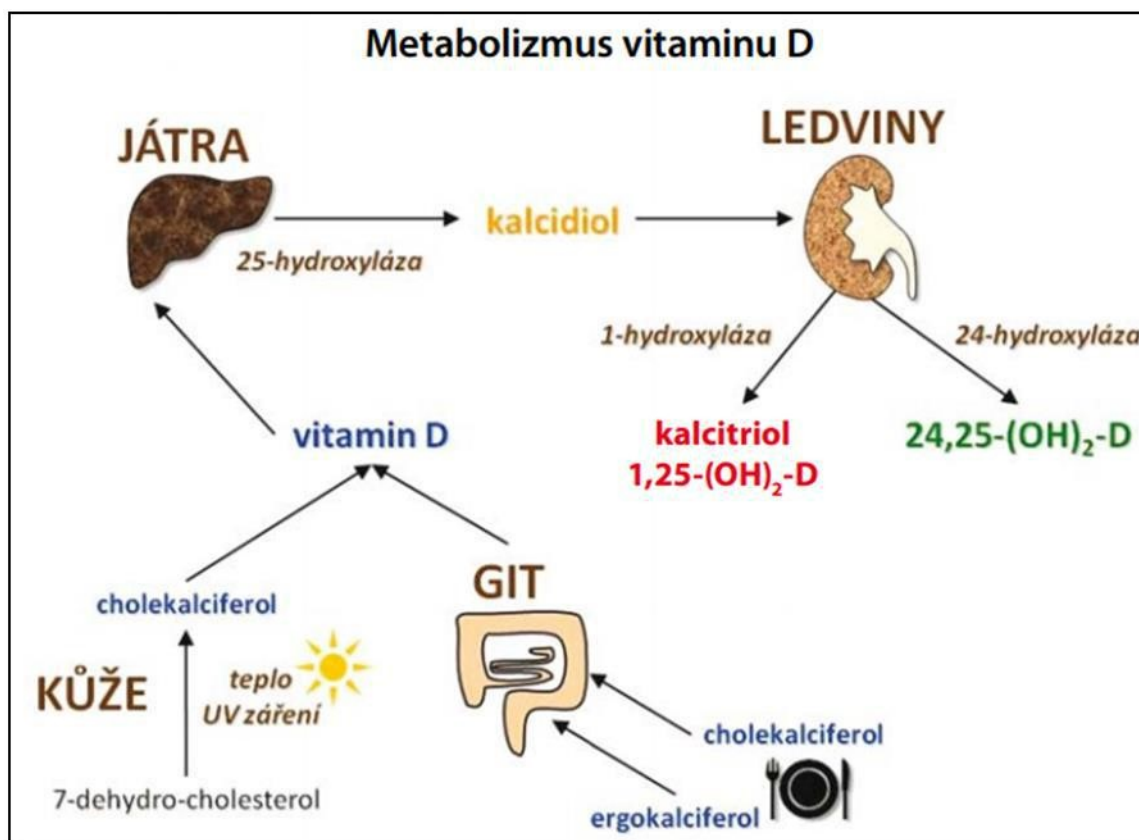
neuromuskulární činnosti, koagulaci, srdeční aktivity. Hormonální regulace metabolismu vápníku i vzájemně související metabolismus fosfátů je složitý proces zahrnující komplexní děje odehrávající se mezi tenkým střevem, kostmi, ledvinami a příštítnými tělisky podílející se na udržování kalciofosfátového metabolismu. Koncentrace vápníku je zpětnovazebně regulována prostřednictvím PTH, kalcitoninu a kalcitriolu. V kostech dochází díky působení PTH k resorpci vápníku, která je naopak potlačena působením kalcitoninu. Ve střevě je stimulována resorpce kalcia, v ledvinách dochází ke zvýšené reabsorpci iontů v proximálním a distálním tubulu. Regulace vápníku je podmíněna expresí receptoru detekující vápník (CASR) ve tkáních (hlavní buňky paratyreoidey, vzestupné raménko Henleovy kličky, sliznice tenkého střeva, kost). Funkce CASR spočívá v útlumu vysoké sekrece parathormonu (PTH) a brání vzniku hyperkalcemie. (Žofková, 2012).

Fosfáty

Fosfáty jsou hlavní intracelulárním anionem. Intracelulární fosfáty jsou estery kyseliny fosforečné. Extracelulární fosfáty jsou převážně anorganické. Jsou tvořeny ze směsi hydrogenfosforečnanů a dihydrogenfosforečnanů. Jsou jedním ze čtyř pufracích systémů těla charakteristických pro udržení acidobazické rovnováhy. Vylučování anorganického fosfátu je řízeno hormonálně a jeho metabolismus úzce souvisí s metabolismem vápníku (Racek, 2006). Na vylučování a regulaci fosfátů se podílí převážně ledviny, kde jsou fosfáty volně filtrovány glomeruly a resorbovány proximálními tubuly. K hyperfosfatémii dochází při výrazném poklesu glomerulární filtrace, která nemůže být již kompenzována poklesem tubulární resorbce, často v důsledku chronického selhání ledvin (CKD) (Horáčková, 2015). CKD vede ke snížené schopnosti ledvin vyloučit fosfáty močí, dále k poruše hydroxylace vitaminu D a snížení absorpce kalcia a fosfátů ve střevech. Následně hyperfosfatémie ovlivňuje regulační hormony, které jsou společné s vápníkem (PTH, vitamin D, FGF23 apod.) (Štěpánková, 2010). Hypofosfatémie nastává u hyperparathyreózy, nedostatku vitaminu D a u některých onemocnění ledvin, kdy dochází k poruše resorpce fosfátů (Racek, 2006).

Vitamin D

Vitamin D patří mezi vitamíny rozpustné v tucích. Jedná se o steroidní hormon. Hlavním zdrojem je endogenní produkce kůží z provitaminu 7-dehydrocholesterolu a následnou hydroxylací v játrech a ledvinách (Obrázek 24) (Zima, 2013).



Obrázek 24: Metabolizmus vitaminu D (Hrdý, *et al.*, 2015)

Jedná se o jeden z nejdůležitějších biologických regulátorů kalciumfosfátového metabolismu na podkladě podpory resorpce vápníku ze střeva. Vitamin D se váže na jaderné receptory v kosti a svalu. Zvyšuje mineralizaci kostí a pravděpodobně jejich novotvorbu a urychluje také růst myofibril. Deficit vitaminu D společně s nízkým příjmem vápníku vede ke zvýšenému riziku osteoporózy a následných osteoporotických fraktur. Byly publikovány i nové poznatky o funkci vitaminu D v onkologii (Lee, *et al.*, 2011). Zvýšené koncentrace Vitaminu D mohou mít za následek iniciaci diferenciace a apoptózy buněk a inhibici proliferace nádorových buněk. Je popsáno, že u onkologicky nemocných dokáže zvýšení hladiny kalcidiolu o 25 nmol/L snížit úmrtnost na karcinom až o 29 % pravděpodobně díky snížení invazivity, angiogeneze a následně i metastatického potenciálu nádoru. Spojitost deficitu vitaminu D je studována také v kardiologii ve vztahu ke kardiovaskulárním onemocněním, v diabetologii byla nalezena u diabetiků 2. typu nepřímá úměra mezi intolerancí glukózy a hladinou vitaminu D. Deficit vitaminu D je dále spojován s poruchou imunity (Hrdý, *et al.*, 2015).

Alkalická fosfatáza (ALP)

ALP je sialoglykoprotein. Tento enzym je přítomen ve všech tkáních a katalyzuje hydrolýzu monoesterů fosfátů. Kostní izoenzym se nachází na povrchu buněk osteoblastů a je důležitý pro kostní mineralizaci. Hladinu tohoto enzymu v séru je možno považovat za ukazatel aktivity osteoblastů, slouží tedy jako marker kostní novotvorby (Žofková, 2012; Pikner, *et al.*, 2020).

β -CrossLaps (β -CTx)

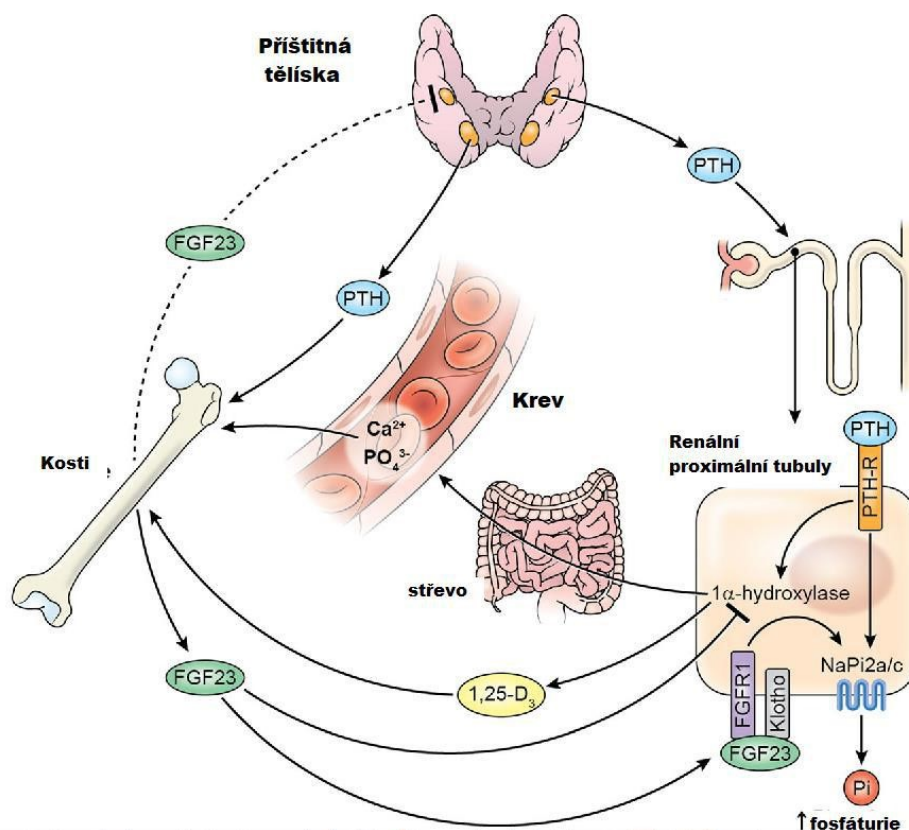
Více než 90 % organické kostní hmoty se skládá z kolagenu typu I. Tento kolagen je při normálním metabolismu degradován na malé fragmenty. Nejvýznamnější z těchto fragmentů je β -izomerizovaný C-terminální příčně vázaný telopeptid kolagenu typu I (β -CTx) (Zima, 2013).

Hladiny β -CTx odrážejí resorpční aktivitu osteoklastů. Kolagen typu I je degradován ve zvýšené míře při osteoporóze. Tento fragment lze detekovat v séru i moči (Pikner, *et al.*, 2020).

FGF23

FGF23 je cirkulující glykoprotein ($M_r = 32$ kDa) patřící do skupiny fosfátových hormonů (fosfatoninů). FGF23 patří do rodiny růstových faktorů FGF a gen FGF23 se nachází na chromozomu 12p3.3. Je exprimován v osteocytech a osteoblastech. Syntéza FGF23 je stimulována fosfáty, 1,25(OH) $_2$ D, PTH a transmembránovým proteinem Klotho.

Sekrece FGF23 z kostních osteocytů působí na ledviny a indukuje fosfaturii prostřednictvím transportérů NaPi2a/c. Podobně působí i PTH, prostřednictvím receptoru pro PTH (PTHr). FGF23 dále inhibuje 1- α -hydroxylázu, snižuje expresi Na/Pi2n ve střevě, a tím snižuje absorpci fosfátů. PTH naopak aktivuje 1- α -hydroxylázu a vzniká aktivní vitamin D (1,25-OH-D $_3$), který je zodpovědný za zvýšenou resorpci vápníku a fosfátů ze střeva a podporuje mineralizaci kostí a zároveň indukuje expresi FGF23 v osteocytech - viz Obrázek 25 (Blau, *et al.*, 2015)



Obrázek 25: Působení FGF23 na metabolismus PTH, vitaminu D a kalcia s fosfáty – upraveno dle (Blau, *et al.*, 2015).

Produkce FGF23 je dále stimulována hypofosfatemii a nedostatkem železa. Naopak nedostatek vápníku a vyšší hladiny železa potlačují produkci FGF23. Metabolismus FGF23 v kosti je ovlivněn proteolýzou furinu, PC5, PC2 s vazebným kofaktorem 7B2. Údaje o eliminaci FGF23 z těla jsou omezené, ale selhání ledvin způsobuje významné zvýšení C-koncových fragmentů a tyto fragmenty jsou vylučovány téměř dvakrát pomaleji než intaktní FGF23. FGF23 byl nalezen v embryonálních i dospělých tkáních. Není spojen s membránou, a proto působí spíše jako hormon než jako receptor na buněčném povrchu. Primárními cílovými orgány FGF23 jsou ledviny a příštítná tělíska (Nilsson, *et al.*, 2016; Burtis, *et al.*, 2012). Zvýšené koncentrace FGF23 v plazmě jsou spojeny s nádorem indikovanou osteomalácií a s chronickým onemocněním ledvin (CKD) (Burtis, *et al.*, 2012). FGF23 je primárně vylučován osteocyty, ale jeho účinky jsou závislé na transmembránovém proteinu Klotho. Klotho je důležitý pro generování transmembranového signálu přes FGFR1. Komplexy receptoru Klotho-FGF23 regulují reabsorpci fosfátu redukcí proteinu transportéru 2a sodíku v proximálním tubulu. Oba hrají roli při sekundárním hyperparatyreoidismu (sHPT), který je běžnou komplikací pacientů s terminálním stadiem onemocnění ledvin (Burtis,

et al., 2012; Takahashi, *et al.*, 2014). X-vázaná hypofosfatemická křivice, autozomálně dominantní hypofosfatemická křivice, nádorem indukovaná onkogenní osteomalacie a primární hyperparatyreóza patří k onemocněním spojeným s abnormálními koncentracemi FGF23 (Burtis, *et al.*, 2012).

1.8. Biomarkery degenerativních onemocnění pohybového aparátu

Druhým z témat práce je využití imunochemických metod v diagnostice degenerativních onemocnění. Konkrétně se práce zabývá stanovením kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině u pacientů s artrózou kolene (gonartrózou).

1.8.1. Gonartróza

Gonartróza je osteoartróza postihující primárně kolenní klouby. Postihuje hlavně hyalinní chrupavku. Metabolismus postižené chrupavky je charakterizován anabolicko - katabolickou nerovnováhou v extracelulární matrici vedoucí k inhibici metabolické aktivity chondrocytů. Dochází ke ztrátě strukturálních proteoglykanů ve tkáni chrupavky a k destrukci polypeptidových agregátů. Dále dochází k syntéze strukturně neúplných makromolekul a k akumulaci degradace sulfatonových glykosaminoglykanů, kyseliny hyaluronové a osteopontinu v biologických tekutinách. Klíčovým patogenním faktorem k destrukci kloubní pojivové tkáně je systém zinku s metaloproteinázou, která má substrátovou specifitu pro hlavní intersticiální kolageny I a II. Negativní roli v poškození velkých kloubů hraje tvorba prozánětlivých cytokinů, převážně interleukinu 1 β a růstových faktorů TGF β (Gladkova, 2020).

Prevalence gonartrózy s věkem stoupá. Vzestup výskytu onemocnění je spojován i se stárnutím a obezitou populace. Vzhledem k tomu dochází ke zvýšení nákladů na zdravotní péči a snížení produktivity pacientů. Diagnóza gonartrózy je založena na radiologických nálezech a k hodnocení strukturální se nejčastěji používá Kellgrenova a Lawrencova stupnice (Villarreal-Ríos, *et al.*, 2019).

Většina pacientů s gonartrózou (GA) začíná dostávat adekvátní léčbu až ve stadiu selhání kloubních orgánů, kdy již není možné výrazně zpomalit progresi patologického procesu. V posledních letech tedy byla naléhavá potřeba identifikovat jasné klinické a morfologické příznaky časně osteoartrózy (Kornilov, *et al.*, 2017). V naší práci se zabýváme možností využití kyseliny hyaluronové jako markeru artrózy.

Kyselina hyaluronová (HA) jako biomarker gonartrózy

Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární polysacharid extracelulární matrice účastnící se řady významných biologických dějů zahrnujících regulační, zánětlivé, imunosupresivní a antiproliferativní účinky. Podílí se zejména na udržování viskoelasticity kapalných tkání, na supramolekulárním prostorovém uspořádání proteoglykanů v extracelulární matrici a regulaci osmotického tlaku, čímž významně ovlivňuje homogenitu tkáně a její homeostatickou integritu. Vzhledem ke své jedinečné viskoelastické povaze a neimunogenicitě je možno HA využít i v řadě klinických aplikací včetně suplementace kloubní tekutiny při osteoartróze, pro usnadnění hojení a regenerace chirurgických ran, a také v oftalmologii, farmakologii a kosmetice (Kotaška, *et al.*, 2018). Kyselina hyaluronová je běžnou součástí většiny pojivových tkání, hraje významnou úlohu při ochraně kloubní chrupavky a transportu živin do chrupavky, je také hlavní složkou synoviální (kloubní) tekutiny. Kloubní tekutina (synoviální tekutina) je tvořena ultrafiltrátem krevní plazmy, který je obohacen o mukopolysacharidy produkované buňkami kloubní výstelky. Funguje jako biologické mazivo a jako prostředí, přes které procházejí živiny a regulační cytokiny. Hlavní složkou synoviální tekutiny je hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti (~ 4–6 MDa, ~ 2–4 mg/mL) (McCarty, *et al.*, 2012). Součástí synoviální tekutiny jsou také molekuly, které jsou klíčové pro správné fungování chrupavek např. proteoglykan 4 (PRG4) nebo povrchově aktivní fosfolipidy a tkáňové makrofágové buňky. Snížené koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině jsou ukazatelem závažnosti artrózy (Tamer, 2013). U pacientů s gonartrózou korelují koncentrace kyseliny hyaluronové se stupněm synoviální proliferace a velikostí osteocytů. Pacienti s vyššími výchozími hodnotami vykazují rychlejší progresivní průběh nemoci (Maziers, *et al.*, 2006; Pavelka, *et al.*, 2004).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo využít imunochemických metod ke stanovení biomarkerů nádorových a degenerativních onemocnění

Konkrétně:

- 1) Stanovit vybrané kandidátní biomarkery karcinomu prostaty (Annexin, SPINK-1, TIMP-1, Chromogranin A, Endoglin, Mindin, Thymidinkináza 1) a vyhodnotit jejich přínos a využití pro diagnostiku karcinomu prostaty**
- 2) Sledovat perioperační dynamiku FGF23 u pacientů s primární hyperparatyreózou**
- 3) Posoudit možnosti využití kyseliny hyaluronové v diagnostice degenerativních onemocnění kloubů (gonartróza kolene)**

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. Hledání nových biomarkerů karcinomu prostaty

3.1.1. Charakteristika pacientů a metod

Odběr vzorků:

Ráno před prostatektomií byly získány vzorky séra a moči pacientů s rakovinou prostaty. Diagnóza rakoviny byla provedena histologickou diagnostikou nádorových vzorků získaných prostatickou resekcí. Vzorky pacientů a zdravých jedinců byly okamžitě zmrazeny, alikvotovány a uchovávány při -70°C , dokud nebyly analyzovány. Informovaný souhlas byl získán u všech jednotlivců zahrnutých do studie.

Klinická charakteristika pacientů:

Pacienti byli klinicky vyšetřováni a klasifikováni podle TNM viz Tabulka 3.

TNM klasifikace vychází z digitálního rektálního vyšetření a posuzuje přítomnost nádoru (T), posouzení lymfatických uzlin s ohledem na přítomnost metastáz (N) a přítomnosti vzdálených metastáz (M). Pacienti zařazení do studie byli posuzováni podle histologicky posouzené přítomnosti nádoru (pT).

Tabulka 3: TNM klasifikace

T-primární nádor (stupeň založený pouze na digitálním rektálním vyšetření [DRE])	
TX	Primární nádor nelze posoudit
T0	Žádný důkaz primárního nádoru
T1	Klinicky nezjistitelný nádor, který není hmatatelný
T1a	Resekován náhodný histologický nález tumoru u 5 % nebo méně tkáně
T1b	Resekován náhodný histologický nález tumoru u více než 5 % tkáně
T1c	Nádor identifikovaný biopsií jehlou (např. Kvůli zvýšenému prostatickému specifickému antigenu [PSA])
T2	Nádor, který je hmatatelný a omezený na prostatu
T2a	Nádor zahrnuje polovinu jednoho laloku nebo méně
T2b	Nádor zahrnuje více než polovinu jednoho laloku, ale ne oba laloky
T2c	Nádor zahrnuje oba laloky
T3	Nádor prochází prostatickou kapslí
T3a	Extrakapsulární prodloužení (jednostranné nebo dvoustranné)
T3b	Nádor napadá semenný váček (y)
T4	Nádor je fixovaný nebo napadá sousední struktury jiné než semenné vajíčky: vnější svěrač, konečník, svaly levatoru a / nebo pánevní stěny

Upraveno dle (EAU, 2021)

Dále byli pacienti klinicky vyšetřováni a klasifikováni podle pokynů Evropské asociace pro urologii (EAU) dle upraveného Gleasonova skóre (GS) podle Mezinárodní společnosti pro urologickou patologii (ISUP), který byl schválen v roce 2014 a omezuje počet tříd karcinomu prostaty v rozmezí od 1 do 5 (EAU, 2021). Gleasonovo skóre popisuje agresivitu nádoru prostaty. Je založeno na vzhledu nádorových žlázek a následně je vzhled hodnocen stupněm 1-5. Patalog na závěr sečte dva nejčastěji se vyskytující stupně, které se objevují v histologických vzorcích. Nádory s vyšším skórem jsou agresivnější a mohou se pohybovat mezi 2 (1+1) až 10 (5+5). Dle nového vyhodnocení se GS vyhodnocuje dle ISUP klasifikace viz Tabulka 4 (EAU, 2021).

Tabulka 4: ISUP klasifikace

Gleasonovo skóre	ISUP
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4, 3+5, 5+3)	4
9-10	5

Upraveno dle (EAU, 2021)

Charakteristika jednotlivých studií je řazena chronologicky

Studie 1: Stanovení Annexinu, SPINK-1, TIMP, Chromograninu A, Endoglinu a TK1

Koncentrace vybraných biomarkerů byly měřeny u 58 pacientů (průměrný věk 68 let, rozmezí 45–82 let) s klinicky diagnostikovaným karcinomem prostaty a 30 zdravých jedinců (průměrný věk 64 let, rozmezí 55–78 let), bez relevantní urologické anamnézy a hodnoty PSA v normě. V souboru pacientů a kontrol byly stanoveny koncentrace Chromograninu A, TK1 v séru a SPINK-1, Endoglin, Annexin a TIMP-1 v moči metodou enzymové imunoanalýzy (ELISA).

Charakteristika metod:

Chromogranin A:

Vyšetřovaný materiál: sérum

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: Cloud-Clone Corp., USA

Analytické parametry:

detekční limit 13,7 pg/mL, pracovní rozsah: 31,2 – 2000 pg/mL, variační koeficient (CV) = 10–12 %

SPINK-1:

Vyšetřovaný materiál: moč

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: Cloud-Clone Corp., USA

Analytické parametry:

detekční limit 0,61 ng/mL, pracovní rozsah: 1,56 – 100,0 ng/mL, CV= 10–12 %

Endoglin:

Vyšetřovaný materiál: sérum, moč

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: Cloud-Clone Corp., USA

Analytické parametry:

detekční limit 0,063 ng/mL pracovní rozsah: 0,156–10,0 ng/mL CV = 10–12%

Annexin:

Vyšetřovaný materiál: moč

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: Cloud-Clone Corp., USA

Analytické parametry:

detekční limit 0,054 ng/mL, pracovní rozsah: 0,156–10,0 ng/mL, CV = 10–12%

TIMP-1:

Vyšetřovaný materiál: sérum, moč

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: RayBiotech, Velká Británie

Analytické parametry:

detekční limit 24,69 pg/mL, pracovní rozsah: 24,69–18 000 pg/mL, CV = 10–12 %

TK1:

Vyšetřovaný materiál: sérum

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: LSBio, Inc., USA

Analytické parametry:

detekční limit 0,063 pmol/L a pracovní rozsah 0,063–4,0 pmol/L, CV = 5,3–8,6 %.

Stanovení Thymidinkinázy (TK-1) - rozšířená studie

Sérové koncentrace TK-1 byly měřeny u 169 pacientů (průměrný věk 62 let, rozmezí 45–82 let) s rakovinou prostaty a kontrolní skupina skládající se z 39 zdravých mužů (průměrný věk 61 let, rozmezí 54–78 let) s nezhoubnou etiologií onemocnění včetně benigní hyperplazie prostaty. Dále byli rozděleni pacienti dle TNM klasifikace do dvou skupin: pacienti pT 1,2 (n = 110) a pacienti pT 3 (n = 59).

Vyšetřovaný materiál: sérum

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: LSBio, Inc., USA

Analytické parametry:

detekční limit 0,063 pmol/L a pracovní rozsah 0,063–4,0 pmol/L, CV = 5,3–8,6

%. **Stanovení epitopu TK210**

Sérové koncentrace TK210 byly měřeny u 126 pacientů (průměrný věk 70 let, rozmezí 46–85 let) s rakovinou prostaty a kontrolní skupina skládající se ze 49 zdravých mužů (průměrný věk 63 let, rozmezí 54–78 let) s nezhoubnou etiologií onemocnění včetně benigní hyperplazie prostaty.

Vyšetřovaný materiál: sérum

Metoda: sendvičová ELISA s preinkubací

Výrobce kitu: AroCell. Švédsko

Analytické parametry:

detekční limit 0,12 ng/mL a pracovní rozsah 0,12–20 ng/mL, CV = 0,9–5,1 %

Studie 2: Stanovení Mindinu (Spondinu 2)

Koncentrace mindinu v séru byly měřeny u 56 pacientů (průměrný věk 68 let, rozmezí 45–82 let) s rakovinou prostaty a v kontrolní skupině sestávající z 29 zdravých mužů (průměrný věk 64 let, rozmezí 55–78 let). Pacienti byli dříve klinicky vyšetřováni a klasifikováni podle pokynů Evropské asociace pro urologii (EAU). Pro další vyšetřování byli pacienti rozděleni do dvou skupin podle závažnosti onemocnění dle ISUP klasifikace. První skupinu tvořili pacienti (n = 36) s méně závažnými nádory (Skupina 1 a 2), druhou skupinu tvořili pacienti (n = 20) s těžkými tumory (Skupina 3 a 4).

Vyšetřovaný materiál: sérum

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: Cusabio, Čína

Analytické parametry:

detekční limit 0,78 ng/mL a pracovní rozsah 3,12–200 ng/mL, se středním variačním koeficientem (CV) = 11 %.

Doplňkové biomarkery:

PSA, -[2]proPSA, free PSA – Beckman Coulter; výpočet PHI

3.2. Sledování perioperační dynamiky FGF23 u pacientů s primární hyperparathyreózou

Charakteristika pacientů a metod

Odběr vzorků:

Vzorky byly odebrány do zkumavky s K₃EDTA. Plazmatické koncentrace C-terminálního FGF23 (cFGF23), intaktního FGF23 (iFGF23), anorganický fosfát, kreatinin, cystatin C a P1NP byly měřeny těsně před řezem, ihned (10 minut) po excizi adenomu příštítných tělísek a pooperační 1. den. Plazmatické koncentrace PTH byly měřeny pouze intraoperačně (těsně před incizí a 10 minut po excizi adenomu). Dále byly provedeny výpočty eGFR z cystatinu C dle Grubbova rovnice a, eGFR z kreatininu dle rovnice CKD-EPI.

Klinická charakteristika pacientů:

Do studie bylo zařazeno 38 pacientů (31 žen ve věku od 24 do 77 let a 7 mužů ve věku od 38 let do 75 let) s primárním hyperparathyreoidismem podrobeným paratyreoidektomií. Průměr adenomu se pohyboval od 5 mm do 30 mm. Pravostranná paratyreoidektomie byla provedena u 17 pacientů (7 pacientů s horní stranou, 10 s dolní stranou), levostranná paratyreoidektomie byla provedena u 13 pacientů (1 pacient s horní stranou, 10 pacientů s dolní stranou, 2 pacienti s oběma stranami), 3 pacienti měli adenom v mediastinu a 5 pacientů podstoupilo kompletní tyreoidektomii. Struma nodosa a tyreotoxikóza se vyskytly u 7 pacientů, u 3 pacientů se vyskytla hypotyreóza a diabetes mellitus typu II. Jeden pacient byl dříve podroben unilaterální nefrektomii v důsledku nefroblastomu.]

U tří pacientů byla provedena opakovaná paratyroidektomie, neboť při první operaci nedošlo k úplné excizi adenomu. U 37 pacientů nebylo zaznamenáno postižení ledvin, koncentrace kreatininu v plazmě byla v rozmezí od 25 do 92 $\mu\text{mol/L}$. Jeden pacient po nefrektomii způsobenou nefroblastomem měl zvýšenou hladinu kreatininu v plazmě 112,3 $\mu\text{mol/L}$ a eGFR (CKD-EPI) = 118,37 mL/min/1,73 m².

cFGF23**Vyšetřovaný materiál:** plazma**Metoda:** sendvičová ELISA**Výrobce kitu:** Immunotopics, Inc. San Clemente, CA**Analytické parametry:** detekční limit 1,5 RU/mL a pracovní rozsah 1,5–660 RU/mL, CV = 1,4–4,7 %, referenční rozmezí 21,6–91 RU/mL**iFGF23****Vyšetřovaný materiál:** plazma**Metoda:** sendvičová ELISA**Výrobce kitu:** Immunotopics, Inc. San Clemente, CA**Analytické parametry:** detekční limit 1,5 pg/mL a pracovní rozsah 1,5–660 pg/mL, CV = 2,0–9,1 %, referenční rozmezí 11,7–48,6 pg/mL**Doplňkové biomarkery:****Cystatin C, Kreatinin, anorganický fosfát**

Kreatinin-kreatináza, cystatin C – imunoturbidimetrie; fosfáty – fosfomolybdenan, analyzátor Advia 1800; PTH a P1NP elektrochemiluminiscenční imunoanalýza, analyzátor Cobas e601

3.3. Posouzení možnosti využití kyseliny hyaluronové v diagnostice degenerativních onemocnění kloubů (gonartróza kolene)

Charakteristika pacientů a metod**Odběr vzorků:**

Vzorky synoviální tekutiny byly odebrány pacientům během operačních výkonů (artroskopie a implantace totální endoprotézy (TEP) kolene), po odběru byly dopraveny do laboratoře, kde byly okamžitě zmrazeny, alikvotovány a uchovávány při -70 °C,

dokud nebyly analyzovány. Informovaný souhlas byl získán u všech jednotlivců zahrnutých do studie.

Po odběru byly vzorky ihned dopraveny do laboratoře, kde byly centrifugovány při 4 °C 10 minut při 3000 otáčkách, následně alikvotovány do 1 mL zkumavek a zamraženy na -80 °C do doby, než byla provedena analýza. Bezprostředně před analýzou byly alikvotované vzorky ředěny PBS pufrům o pH 7,4 v poměru 1:5000. Jako doplňkový parametr použitý pro hodnocení fyzikálně chemických kritérií artrózy na základě posouzení viskozity a viskoelasticity byla v odebraných primárních vzorcích měřena osmolalita pomocí kryoskopické metody na analyzátoru Advanced 2020.

Klinická charakteristika pacientů:

Do studie bylo zařazeno celkem 67 pacientů průměrného věku 67 let (35 mužů, průměrný věk 65 let a 32 žen, průměrný věk 68 let) s diagnostikovanou artrózou kolenního kloubu definovanou dle RTG klasifikace podle Kellgrena a Lawrence. Pacienti byli rozděleni do čtyř skupin dle závažnosti postižení (1. skupina – gonartróza 1. stupně až 4. skupina – gonartróza IV. stupně, nejtěžší stupeň postižení).

Vyšetřovaný materiál: synoviální tekutina

Metoda: sendvičová ELISA

Výrobce kitu: Teco Hyaluronic acid, Švýcarsko

Analytické parametry:

detekční limit 2,7 mg/L, pracovní rozsah metody 2,7–1000 mg/L, CV = 2,8–5,2 %.

3.4. Statistické metody

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí standardních statistických testů. Normalita distribuce dat v jednotlivých studiích byla vyhodnocována pomocí D'Agostino Pearsonova testu. Porovnání koncentrací sledovaných biomarkerů v jednotlivých skupinách bylo hodnoceno pomocí neparametrického Mann-Whitneyova testu. Analýza ROC byla využita k hodnocení diagnostické účinnosti. Multivariantní analýza byla využita k posouzení závislosti koncentrací na věku, pohlaví a klinickém stavu pacienta. K vyhodnocení korelačních závislostí byla, využita regresní analýza. K vyhodnocení vztahu mezi analyty byla použita analýza rozptylu. Hladina pravděpodobnosti $p < 0,05$ byla zvolena jako statisticky významná. Data byla vyhodnocena pomocí statistických

programů GraphPad Prism, verze 8.02 (San Diego, USA) a MedCalc verze: 18.02.01
(Ostende, Belgie)

4. VÝSLEDKY

4.1. Hledání nových biomarkerů karcinomu prostaty

Studie 1: Stanovení Annexinu, SPINK-1, TIMP-1, Chromograninu A, Endoglinu a TK1

Koncentrace sledovaných analytů a jejich diagnostická účinnost vyjádřená z analýzy ROC jako hodnota AUC (plochy pod křivkou) jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky Annexin, SPINK-1, TIMP-1, Chromogranin A, Endoglin, TK1

<i>Biomarker</i>	<i>Kontrolní skupina (n = 30)</i>	<i>Pacienti (n = 58)</i>	<i>P value</i>	<i>AUC</i>
S-chromogranin (pg/mL)	114,500 ± 41,320	83,880 ± 88,610	0,162	0,59
U-SPINK-1 (ng/mL)	1,548 ± 1,719	1,592 ± 2,712	0,658	0,53
U-Endoglin (ng/L)	0,404 ± 0,270	0,379 ± 0,454	0,874	0,51
S-Endoglin (ng/mL)	0,840 ± 0,416	0,780 ± 0,320	0,910	0,51
U-Annexin (ng/mL)	0,176 ± 1,296	0,184 ± 0,598	0,839	0,51
U-TIMP-1 (pg/mL)	13,128 ± 197,400	7,750 ± 866	0,189	0,55
S-TIMP-1 (μg/L)	16,897 ± 1,807	17,782 ± 2,461	0,211	0,62
S-TK1 (pmol/L)	0,072 ± 0,063	0,2040 ± 0,0423	<0,0001	0,80

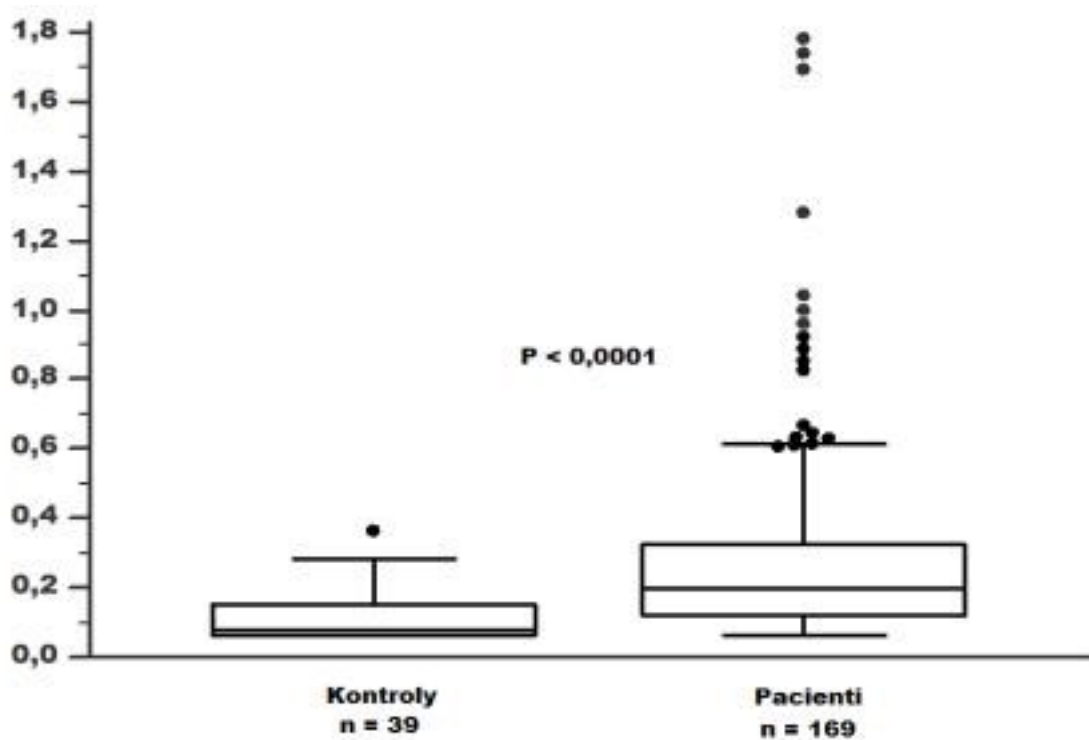
Koncentrace biomarkerů jsou vyjádřeny jako medián (95% interval spolehlivosti pro medián)

Byly nalezeny signifikantní rozdíly v sérových koncentracích thymidinkinázy u pacientů s karcinomem prostaty oproti kontrolní skupině. TK1 ukazuje vyšší diagnostickou účinnost oproti ostatním sledovaným biomarkerům. Na základě těchto výsledků byla provedena rozšířená studie na větším souboru pacientů.

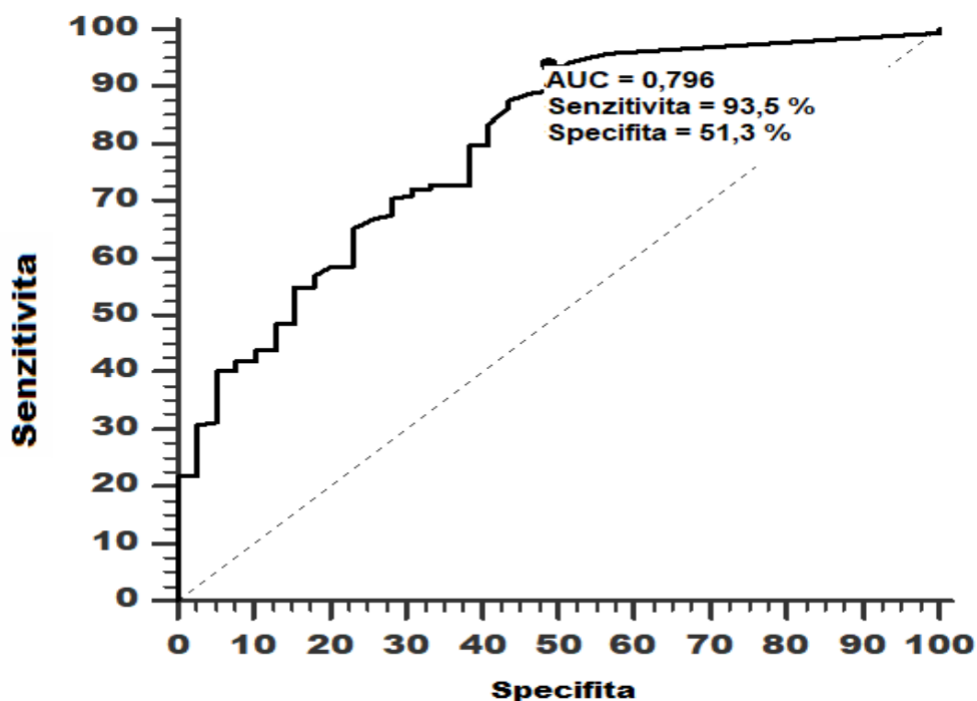
Stanovení thymidinkinázy TK1 – rozšířená studie

Sérové hladiny thymidinkinázy 1 u pacientů s karcinomem prostaty byly významně zvýšeny ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých mužů (medián = 0,196 pmol/L vs. medián = 0,076 pmol/L, $P < 0,0001$, obrázek 26). Diagnostická účinnost TK1 vyjádřená jako AUC vypočtená z analýzy ROC byla 0,80 (specifita = 51,3 % a senzitivita = 93,5 %, obrázek 27).

Obrázek 26: Distribuce hodnot TK1 v souboru pacientů s karcinomem prostaty a u zdravých kontrol



Výsledky jsou vyjádřeny jako krabicové grafy s mediánem mezikvartilového rozpětí (25.–75. percentil).

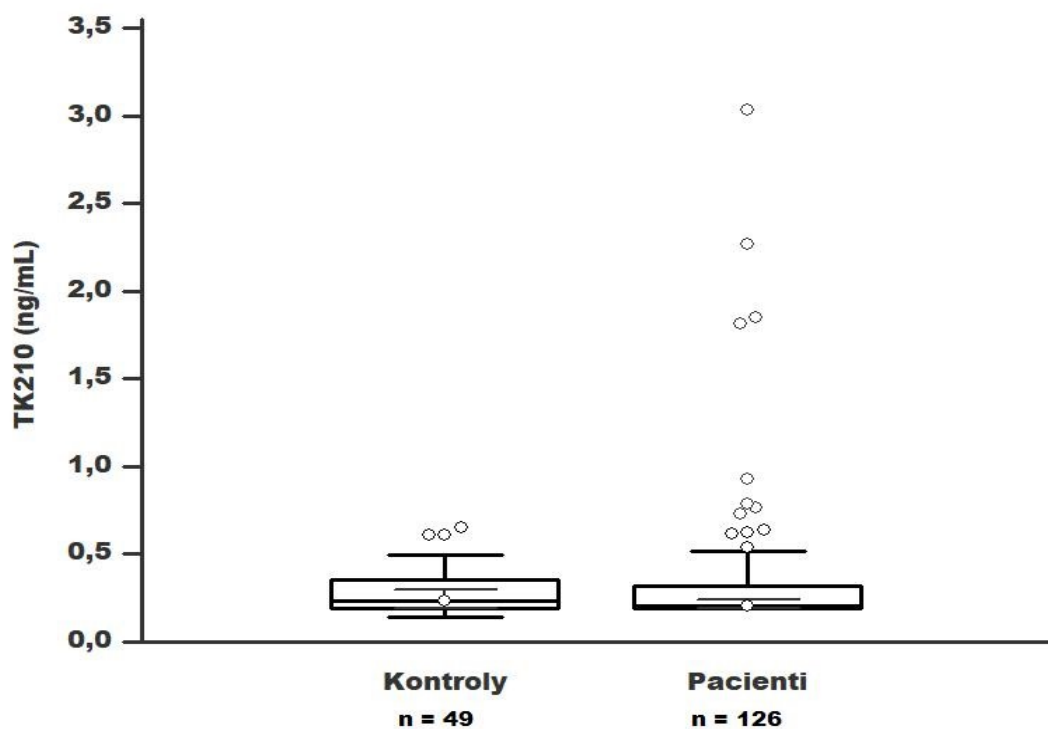
Obrázek 27: Diagnostická účinnost TK1

Sérové hladiny TK1 u pacientů s méně závažným onemocněním hodnoceným dle TNM klasifikace (pT1, pT2) a u pacientů se závažným onemocněním dle TNM klasifikace (pT3) byly významně zvýšeny ve srovnání s kontrolní skupinou ($P < 0,0001$ a $P = 0,0026$). Hodnocení závažnosti dle klasifikace ISUP (Skupina 1 – méně závažné onemocnění – stadium 1,2 a skupina 2 - závažné onemocnění – stadium 3,4,5) ukazuje významné zvýšení koncentrací ve srovnání s kontrolní skupinou ($P < 0,001$; $P = 0,0030$).

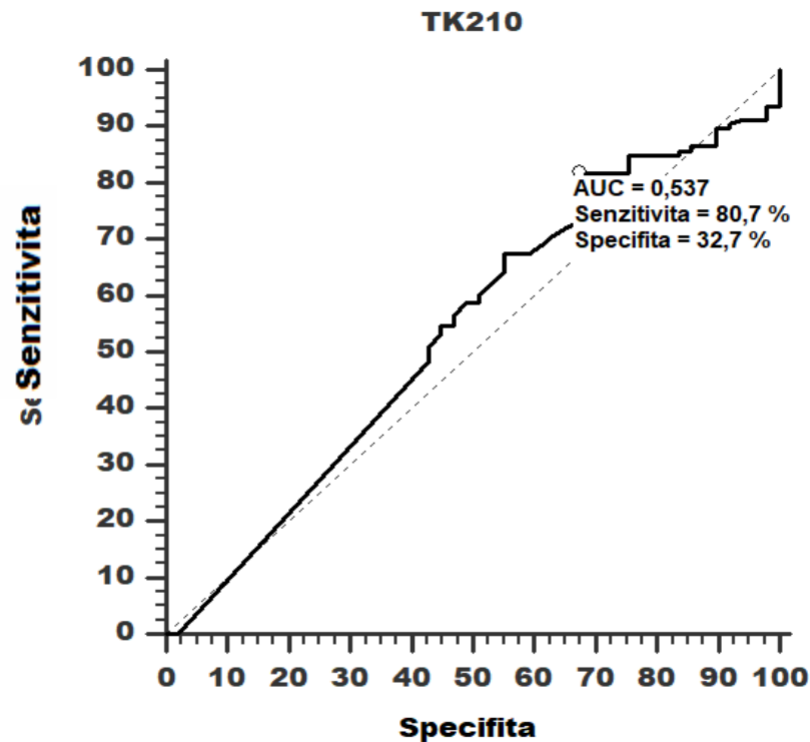
Stanovení epitopu TK210

Sérové hladiny thymidinkinázy 210 u pacientů s karcinomem prostaty byly zvýšeny ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých mužů (0,292 ng/mL vs. 0,246 ng/mL, $P = 0,6109$, obrázek 28). Diagnostická účinnost sérové TK210 vyjádřená jako AUC vypočtená z analýzy ROC byla 0,54 (specifita = 80,7% a senzitivita = 32,7 % , obrázek 29).

Obrázek 28: Distribuce hodnot TK210 v souboru pacientů s karcinomem prostaty a u zdravých kontrol



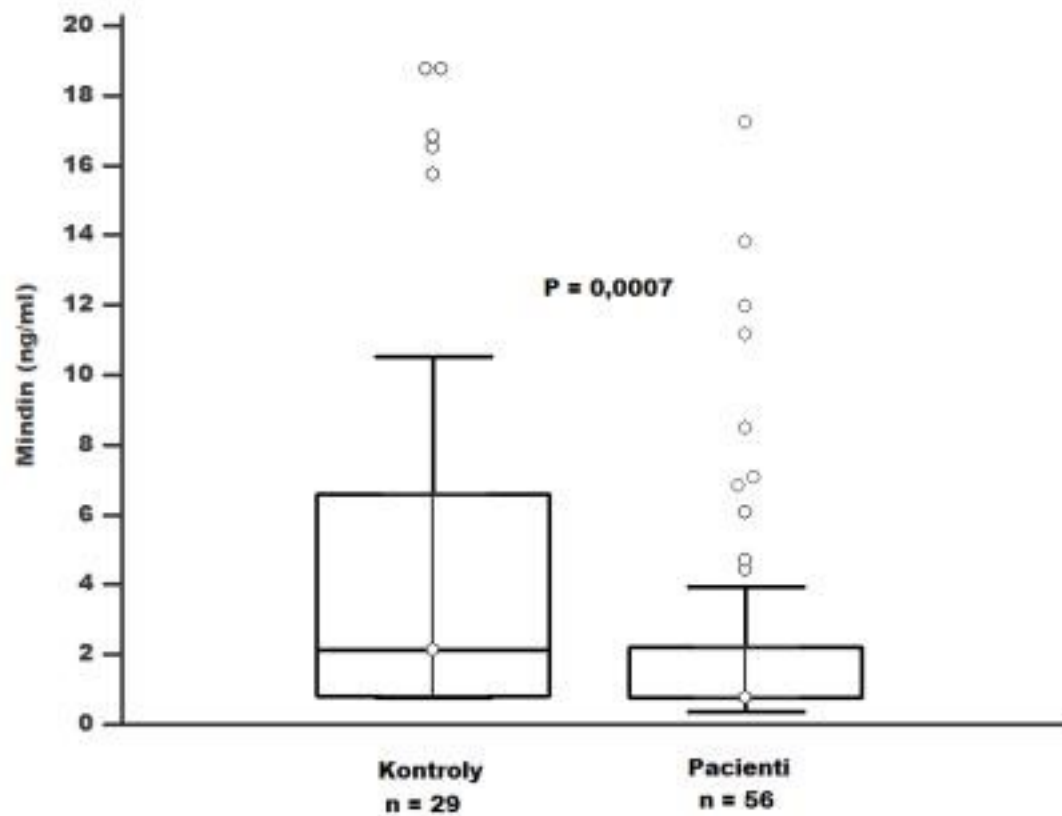
Výsledky jsou vyjádřeny jako krabicové grafy s mediánem mezikvartilového rozpětí (25.–75 percentil).

Obrázek 29: Diagnostická účinnost TK210**Studie 2: Stanovení Mindinu**

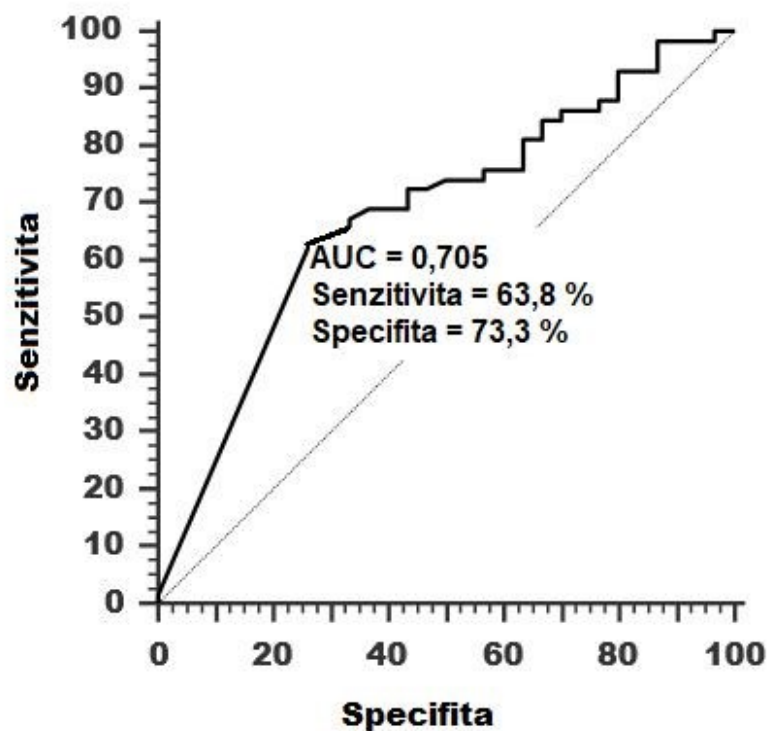
Sérové hladiny mindinu u pacientů s rakovinou prostaty byly významně sníženy oproti kontrolní skupině vyjádřené jako mediány (2,12 ng /mL vs 0,78 ng/mL, $P = 0,0007$, obrázek 30).

Diagnostická účinnost sérového mindinu vyjádřená jako AUC vypočtená z analýzy ROC byla 0,71 (specifita = 73 % a senzitivita = 64 %) (Obrázek 31). Sérové hladiny mindinu u pacientů s méně závažnými nádory (pT1 a pT2) a se závažnými nádory (pT3 a pT4) jsou sníženy ve srovnání s kontrolní skupinou. ($P = 0,012$, $P = 0,020$).

Obrázek 30: Distribuce hodnot Mindinu v souboru pacientů s karcinomem prostaty a u zdravých kontrol



Výsledky jsou vyjádřeny jako krabicové grafy s mediánem mezikvartilového rozpětí (25.–75. percentil).

Obrázek 31: Diagnostická účinnost mindinu

4.2. Sledování perioperační dynamiky FGF23 u pacientů s primární hyperparatyreózou

Koncentrace všech biomarkerů měřené před- a pooperačně u pacientů s pHPT jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Koncentrace biomarkerů měřené před a pooperačně u pacientů s pHPT

	intraoperativní		Postoperativní	P value	
	těsne před operací (n=38)	10 min po operaci (n=38)	Další den po operaci (n=38)	Před vs. 10 min po operaci	Před vs. den po operaci
<i>P_cFGF23 (RU/mL)</i>	89,17 (74,58–102,6)	87,83 (78,42–99,54)	22,23 (14,41– 31,91)	P = 0,93	P <0,0001
<i>iFGF23 (pg/mL)</i>	56,87 (45,58–67,41)	57,05 (78,42–99,54)	<1,5	P = 0,89	P <0,0001
<i>P_anorganický fosfát (mmol/L)</i>	0,80 (0,69–0,93)	0,80 (0,73–0,91)	1,03 (0,91–1,26)	P = 0,76	P = 0,0025
<i>S_Ca (mmol/L) *</i>	2,71 (2,61–2,82)	neměřeno	2,22 (2,15–2,34)	----	P <0,0001
<i>Kreatinin (μmol/L)</i>	58,51 (54,81–62,11)	62,52 (50,16–72,38)	72,51 (62,33–75,51)	P = 0,77	P = 0,08
<i>Cystatin C (mg/L)</i>	1,01 (0,94–1,06)	0,97 (0,86–1,03)	1,06 (1,10–1,20)	P = 0,45	P = 0,11
<i>PINP (μg/L)</i>	61,75 (54,43–78,84)	61,75 (49,47–73,27)	62,04 (54,92–67,71)	P = 0,92	P = 0,92
<i>eGFR Cystatin C (ml/min/1,73m²)</i>	83,29 (76,79–93,97)	89,16 (80,59–109,1)	76,79 (62,35–84,69)	P = 0,46	P = 0,12
<i>eGFR Kreatinin CKD-EPI (ml/min/1,73m²)</i>	116,3 (101,4–143,6)	128,7 (103,32–136,6)	107,1 (89,8–136)	P = 0,62	P = 0,40
<i>PTH (pmol/L)</i>	13,10 (10,22–14,37)	4,17 (2,85–5,97)	neměřeno	P <0,0001	-----

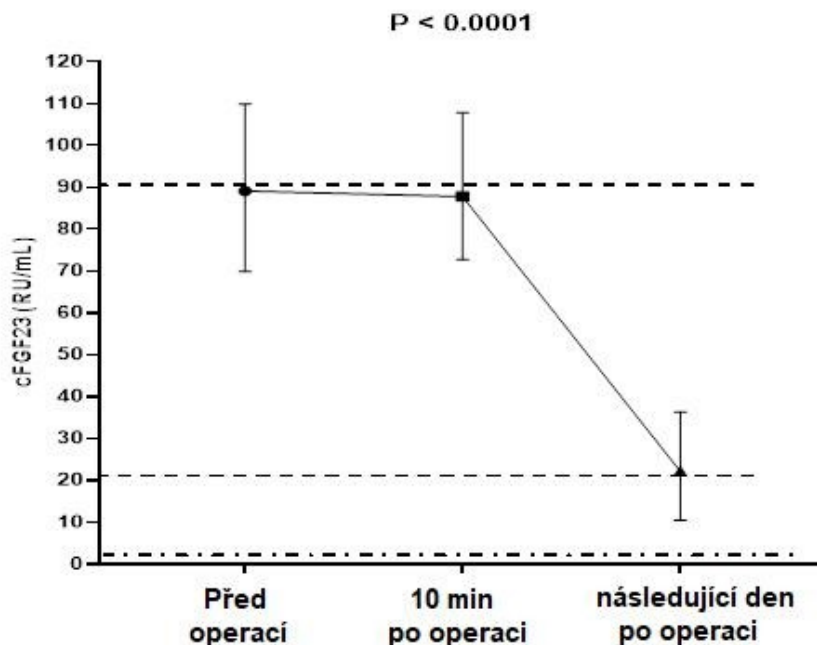
Koncentrace biomarkerů jsou vyjádřeny jako medián (95% interval spolehlivosti pro medián)

* Hodnoty sérového Ca byly získány z lékařských záznamů pacientů

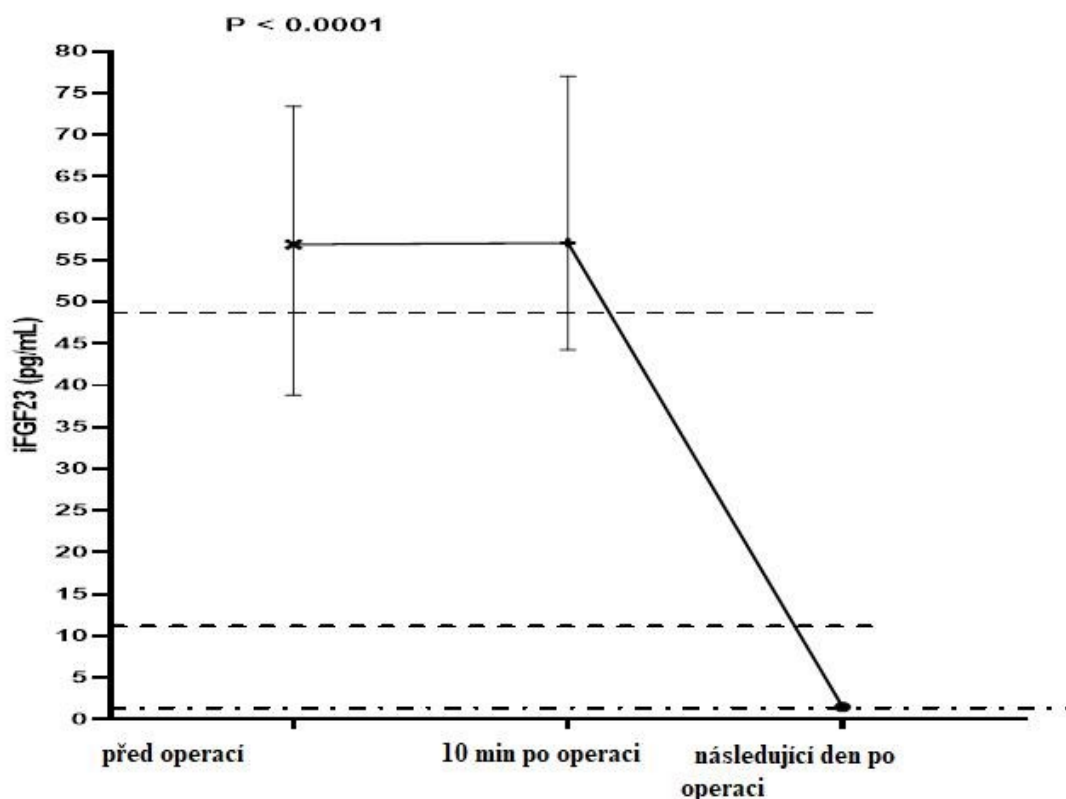
Hladiny PTH v plazmě byly významně sníženy intraoperačně (13,10 vs. 4,17 pmol/L, P <0,0001), intraoperační hladiny všech ostatních biomarkerů se nezměnily. Pooperační den 1 se zvýšily hodnoty anorganických fosfátů (1,03 mmol/L vs. 0,8 mmol/L, P = 0,0025), plazmatické koncentrace cFGF23 poklesly (89,17 vs. 22,23 RU/mL,

$P < 0,0001$, obrázek 32). Podobně se snížily také hodnoty iFGF23 pooperačně, ale pooperační hodnoty byly nižší než detekční limit soupravy (obrázek 33, tabulka 6).

Obrázek 32: Perioperační změny plazmatických hodnot cFGF23 u pacientů s pHPT



Výsledky jsou vyjádřeny jako medián s mezikvartilovým rozsahem (IQR). Tečkované čáry ukazují horní a dolní hranici referenčního intervalu. Polotečkovaná čára zobrazuje hodnotu detekčního limitu nastaveného na 1,5 pg/mL nebo 1,5 RU/mL.

Obrázek 33: Perioperační změny plazmatických hodnot iFGF23 u pacientů s pHPT

Výsledky jsou vyjádřeny jako medián s mezikvartilovým rozsahem (IQR). Tečkované čáry ukazují horní a dolní hranici referenčního intervalu. Polotečkovaná čára zobrazuje hodnotu detekčního limitu nastaveného na 1,5 pg/mL nebo 1,5 RU/mL.

Zjistili jsme významnou korelaci mezi FGF23 a anorganickými fosfáty (cFGF23: Spearmanův $r = -0,253$, $P = 0,0065$; iFGF23: Spearmanův $r = -0,245$, $P = 0,0085$) a mezi předoperačním FGF23 a eGFR (cystatin C) (cFGF23: Spearmanův $r = -0,499$, $P = 0,0014$; iFGF23: Spearmanův $r = -0,491$, $P = 0,0017$). Korelace mezi pooperačním FGF23 a celkovým vápníkem (cFGF23: Spearmanův $r = 0,5982$, $P = 0,0008$, iFGF23: Spearmanův $r = 0,41$, $P = 0,02$) byla také významná.

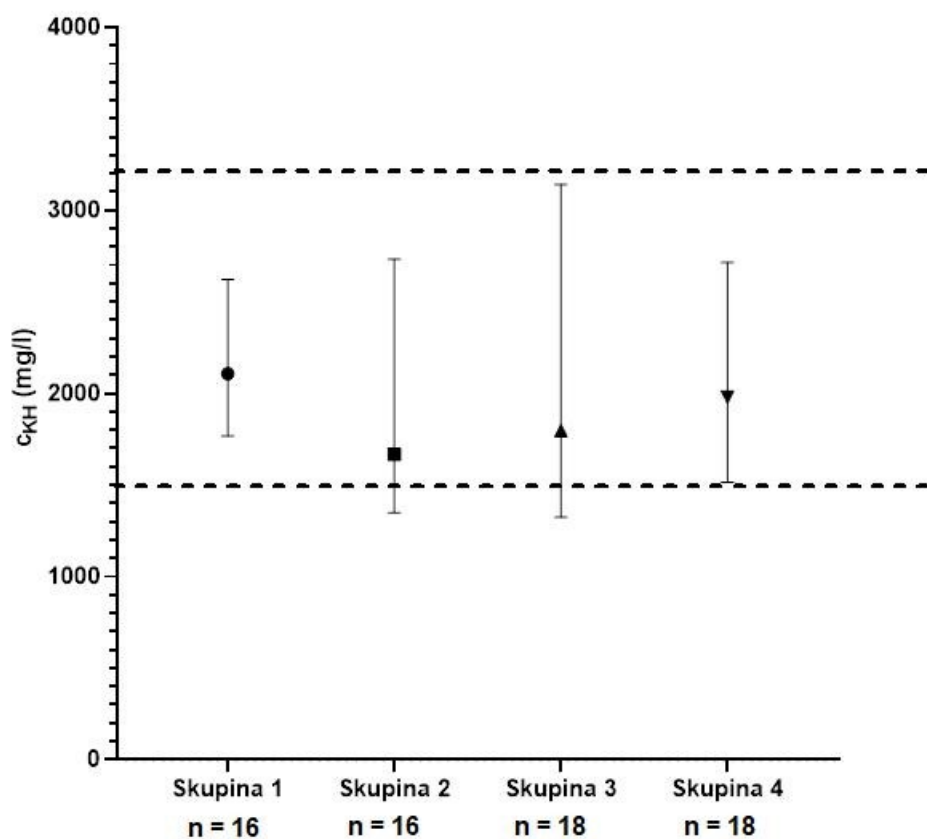
4.3. *Posouzení možnosti využití kyseliny hyaluronové v diagnostice degenerativních onemocnění kloubů (gonartróza kolene)*

Průměrné koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině v jednotlivých skupinách byly následující: Skupina 1: HA = 2302 mg/L (n = 16), Skupina 2: HA = 2234 mg/L (n = 16), Skupina 3: HA = 2300 mg/L (n = 18), Skupina 4: HA = 2446 mg/L (n = 18). Distribuce hodnot kyseliny hyaluronové v jednotlivých skupinách s vyznačením referenčního intervalu je znázorněna na obrázku 34. Rozdíly koncentrací HA mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné. Koncentrace HA v synoviální tekutině se nelišily od publikovaných referenčních hodnot 1500–3200 mg/L.

Nelze tedy jednoznačně prokázat korelaci koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině se závažností onemocnění hodnocenou dle radiologických kritérií.

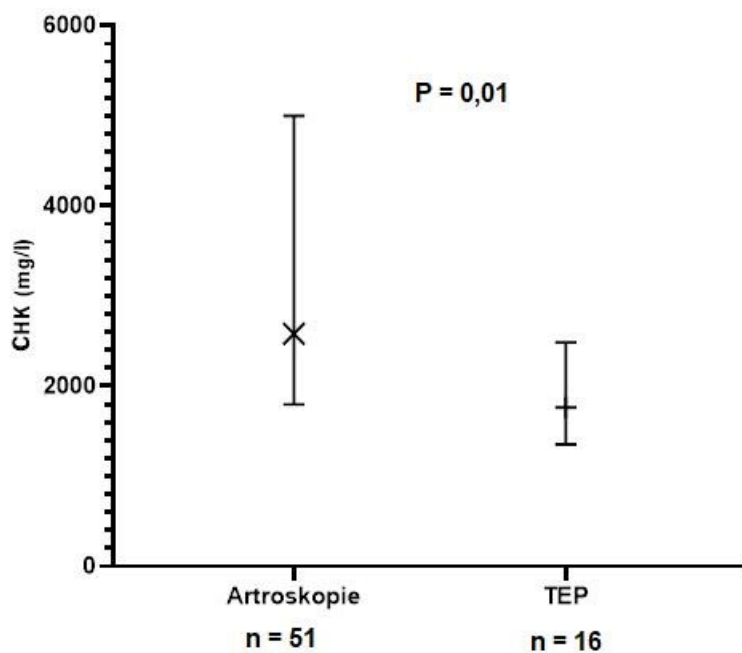
Pacienti, kteří podstoupili artroskopii, ale mají signifikantně zvýšené koncentrace v synoviální HA oproti pacientům, kteří podstoupili totální endoprotézu (2581 mg/L vs. 1763 mg/L, $P = 0,01$, obrázek 35). Závažnost onemocnění posouzená dle fyzikálně chemických kritérií vyšetřením osmolality v synoviální tekutině u pacientů s gonartrózou ukazuje významnou korelaci koncentrací kyseliny hyaluronové s hodnotami osmolality (Speramanův $r = 0,29$, $P = 0,015$, obrázek 36).

Obrázek 34: Distribuce hodnot koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou (Skupina 1 – nejméně závažná forma onemocnění, skupina 4, nejzávažnější forma onemocnění)



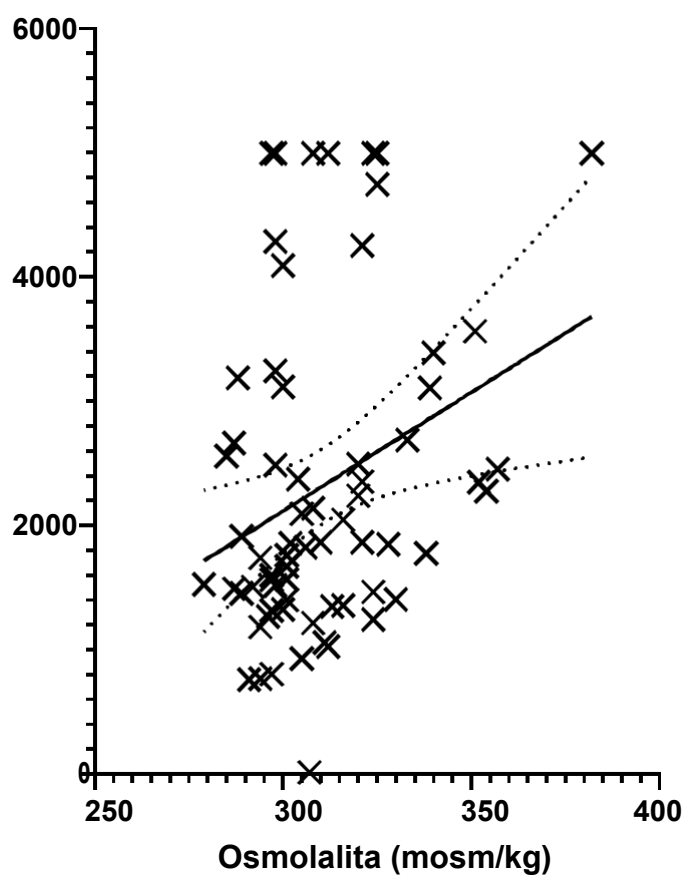
Data v grafu jsou vyjádřena jako medián a mezikvartilové rozpětí (25. a 75. percentil). Přerušované čáry znázorňují hodnoty referenčního intervalu 1500 - 3200 mg/L publikované ve studii Palmieriho et al. (Palmieri, et al., 2017). Rozdíly mezi koncentracemi HA v jednotlivých skupinách nebyly statisticky významné. Skupina 1 (n=16), skupina 2 (n = 16), skupina 3 (n=18), skupina 4 (n=18).

Obrázek 35: Distribuce hodnot koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů po artroskopii a po totální endoprotéze



Výsledky jsou vyjádřeny jako krabicové grafy s mediánem a mezikvartilovým rozpětím (25. - 75. percentil) pacienti po artroskopii: Skupina po artroskopii ($n = 51$), skupina po TEP ($n = 16$)

Obrázek 36: Vzájemná korelace koncentrací kyseliny hyaluronové a osmolality v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou



Tečkované čáry vymezují oblast 95% intervalu spolehlivosti regresní přímky

4. DISKUZE

V první části práce jsme se zabývali hledáním vhodných biomarkerů pro screening karcinomu prostaty. Do pilotní studie jsme zařadili Chromogranin A, SPINK, Endoglin 2, Annexin, TIMP-1 a Thymidinkinázu 1, které se dle dostupných literárních dat (Niedworok *et al.*, 2017; Tomlins, 2008; Romero *et al.*, 2011; Shyh Han, *et al.*, 2021; Gong *et al.*, 2015) jeví jako vhodné doplňkové markery u karcinomu prostaty. Na základě analýzy ROC byla posouzena diagnostická účinnost biomarkerů s ohledem na diagnostiku karcinomu prostaty a ukázalo se, že ve sledovaném souboru pacientů byla diagnostická účinnost vybraných parametrů nízká (AUC = 0,51 pro Endoglin až AUC = 0,62 pro TIMP-1) s výjimkou Thymidinkinázy 1, kde byla stanovena hodnota AUC = 0,80. Nízké hodnoty AUC u ostatních parametrů mohou být dány náhodným výběrem pacientů s různě závažnými formami onemocnění.

Na základě výsledků první studie byla dále ověřena diagnostická účinnost TK1 na rozšířeném souboru pacientů s karcinomem prostaty. Bylo prokázáno, že sérové hladiny TK1 byly významně zvýšeny u pacientů ve srovnání se zdravými jedinci. Tyto výsledky potvrdily výsledky získané jinými autory (Jagarlamudi, *et al.*, 2015; Li, *et al.*, 2018). Výsledky naší studie ukázaly velmi dobrou diagnostickou účinnost TK1 v séru (AUC = 0,80, specifita 51,3 % a senzitivita 93,5 %) srovnatelnou s výsledky podobné studie Jagarlamundiho *et al.* (AUC = 0,88, specifita = 0,96, senzitivita = 0,64). Mezi oběma studiemi nebyl významný rozdíl v hodnotách AUC ($P = 0,14$). Nedávné publikace zmiňují sledování katalytické aktivity TK1 s ohledem na proliferaci nádorů (Jagarlamudi, *et al.*, 2018). Nicméně, diagnostický význam stanovení koncentrací TK1 se zdá být vyšší oproti katalytickým aktivitám TK1. Je popisováno, že koncentrace TK1 vykazují konzistentnější výsledky a jeví se vhodnější k vyšetření solidních nádorů (Jagarlamudi, *et al.*, 2018). Zjistili jsme významné rozdíly mezi sérovými koncentracemi TK1 v kontrolní skupině zdravých jedinců a pacientů s různě závažnými formami karcinomu hodnocenými dle TNM klasifikace ($P < 0,0001$ pro méně závažné formy a $P = 0,0026$ pro závažné formy). Tyto výsledky korelují se skutečností, že exprese TK1 je většinou spojena s proliferací nádorů. Nedávné publikace také ukazují vzájemný vztah koncentrací TK1 se stupněm onemocnění podle Gleasonova skóre (GS). Zjistili jsme významné rozdíly mezi kontrolní skupinou zdravých jedinců a pacientů hodnocených dle klasifikace ISUP založené na hodnocení GS ($P < 0,0001$ a $P = 0,003$). Obdobné výsledky publikovali i Jagarlamudi a Li. (Jagarlamudi, *et al.*, 2015; Li, *et al.*,

2018). Na základě těchto výsledků lze tedy prokázat, že koncentrace TK1 koreluje s klinickou závažností onemocnění, klasifikovanou pomocí klasifikace ISUP. Tyto výsledky tedy potvrzují možnost využití TK1 jako doplňkového biomarkeru karcinomu prostaty.

Na základě předchozích výsledků byla provedena multivariantní analýza u 65 pacientů závislosti TK1, PSA, [-2]proPSA a PHI se závažností onemocnění dle klasifikace ISUP a TNM. Nalezli jsme významnou závislost mezi TK1 ($P = 0,061$) a PHI ($P = 0,019$) v závislosti na hodnocení dle klasifikace TNM, zatímco ve srovnání s hodnocením klinické závažnosti dle ISUP nebyla závislost TK1 a PHI významná ($P = 0,465$ a $P = 0,24$). Naopak hodnoty PSA a [-2]proPSA byly významně závislé na hodnocení závažnosti dle klasifikace ISUP ($P = 0,014$; $P = 0,037$). Rozdíly v závislostech biomarkerů mohou být dány rozdílnými kritérii hodnocení závažnosti onemocnění, které jsou specifické pro jednotlivé klasifikace. Kritéria hodnocení jsou popsána v kapitole 3.1.1.

Třetí část studie se zabývala stanovením epitopu TK210. Současné literární údaje ukazují, že stanovení epitopu TK210 by mělo být specifitější vzhledem k stanovení koncentrace TK1, nicméně naše výsledky tento předpoklad nepotvrdily, jak ukazují obrázky 28 a 29. Studie Jagarlamundiho *et al.* ukazuje pro TK210 hodnotu $AUC = 0,67$ a ve spojení s PHI dokonce $0,78$, zatímco v naší studii jsme stanovili pro TK210 hodnotu $AUC = 0,54$, hodnoty PHI byly k dispozici u 36 pacientů, ale PHI nebylo měřeno u kontrolní skupiny. Na základě předchozích výsledků a literárních poznatků byla provedena multivariantní analýza závislosti TK210, TK1, PSA, proPSA a PHI se závažností onemocnění dle klasifikace ISUP a TNM. Dle klasifikace TNM byla nalezena závislost PHI ($P = 0,007$) na stadiu onemocnění, zatímco u klasifikace ISUP jsme prokázali závislost u [-2]proPSA ($P = 0,036$). Rozdíly v závislostech biomarkerů mohou být dány rozdílnými kritérii hodnocení závažnosti jednotlivých klasifikací. A také charakterem sledovaného souboru pacientů.

Následující studie byla zaměřena na stanovení mindinu v séru pacientů s karcinomem prostaty. Sérové hladiny mindinu byly významně sníženy u pacientů s rakovinou prostaty ve srovnání se zdravými jedinci. Tyto výsledky se liší od výsledků jiných podobných studií prezentujících zvýšené hladiny mindinu u pacientů s karcinomem prostaty (Lucarelli, *et al.*, 2013; Qian, *et al.*, 2012). Výsledky naší studie však koreluje se studií Wang *et al.*, ukazující signifikantně sníženou hladinu sérového mindinu u pacientů s nádory tlustého střeva, plic, žaludku, jícnu a prsu (Wang, *et al.*,

2018). Wang *et al.* zmiňují důležitou roli regulačního proteinu Egr1, který přímo reguluje expresi mindinu na transkripční úrovni tím, že se váže na specifickou sekvenci promotoru genu pro mindin. Obdobné výsledky publikovali také Jokerst *et al.*, kteří prokázali snížené hladiny mindinu u pacientů s karcinomem prostaty ve srovnání s pacienty s benigní hyperplázií prostaty a s pacienty po prostatektomii (Jokerst, *et al.*, 2015). Autoři také prokázali podobnou diagnostickou účinnost mindinu ($AUC = 0,76$, $P < 0,0001$), která byla srovnatelná s výsledky získanými v naší studii ($AUC = 0,71$ s $P = 0,0007$). Dále jsme potvrdili, že hladiny mindinu v séru nejsou závislé na koncentracích PSA, ale souvisejí s věkem ($P = 0,014$). Sérové hladiny mindinu se u pacientů s karcinomem prostaty liší v závislosti na klinickém stavu. Obdobně jako v případě TK1 jsme zjistili významné rozdíly mezi sérovými koncentracemi mindinu v kontrolní skupině zdravých jedinců a pacientů s různě závažnými formami karcinomu hodnocenými dle TNM klasifikace ($P = 0,012$ a $P = 0,020$). Výsledky pilotní studie potvrzují významnou roli mindinu jako doplňkového biomarkeru v diagnostice rakoviny prostaty.

V další studii jsme se zabývali sledováním peroperační dynamiky FGF23 u pacientů s primární hyperparatyreózou, kteří podstoupili paratyreoidektomii. Signifikantní pokles perioperačních koncentrací PTH je důkazem úspěšně provedené paratyreoidektomie. Potvrdili jsme sníženou koncentraci PTH v plazmě 10 minut po paratyreoidektomii ve srovnání s hodnotami před paratyreoidektomií (4,17 vs. 13,10 pmol/L, $P < 0,0001$) (tabulka 6). Hyperkalcémie je důležitým diagnostickým indikátorem primární hyperparatyreózy. Na základě údajů ze zdravotnické dokumentace byly potvrzeny zvýšené hladiny vápníku v séru před paratyreoidektomií (medián = 2,71 mmol/L s významným snížením referenčního rozmezí následující den po excizi adenomu (medián = 2,22 mmol/L, $P < 0,0001$) (tabulka 6). Pacienti s hyperparatyreoidektomií mají významné poruchy kalciofosfátového metabolismu. Jedním z regulátorů kalciofosfátového metabolismu je FGF23, a proto jsme se v naší práci zaměřili na posouzení peroperační dynamiky FGF23 u pacientů s hyperparatyreózou s ohledem na možné změny kalciofosfátového metabolismu. Počáteční a intraoperační hodnoty cFGF23 a iFGF23 byly na horní úrovni nebo nad horní úroveň referenčních intervalů, jak ukazuje obrázek 32 a 33. Podobné výsledky byly recentně publikovány (cFGF23, iFGF23 byly významně zvýšené u pacientů s pHPT před paratyreoidektomií). (Nilsson, *et al.* 2016; Witteveen, *et al.* 2012). Yamashita *et al.* prokázali významně zvýšené hladiny iFGF23 v séru u pacientů s pHPT ve srovnání se zdravými kontrolami, ale rozdíly mezi hladinami iFGF23 u pacientů s pHPT s normální funkcí ledvin (clearance kreatininu

≥ 70 ml/min/1,73 m² vypočtená ze sérového kreatininu a hladiny kreatininu v moči za 24 hodin) a zdravé kontrolní skupiny nebyly významné (Yamashita, *et al.* 2014). Negativní korelace FGF23 s glomerulární filtrací je typická u pacientů s chronickým onemocněním ledvin (Takahashi, *et al.* 2014; Komaba, *et al.* 2009; Kobayashi, *et al.* 2006). Ačkoli žádný z našich pacientů zařazených do studie neměl známky ledvinového selhání charakterizovaného sníženými hodnotami glomerulární filtrace (1 mmol/s/1,73 m²), zjistili jsme významnou negativní korelaci předoperačních cFGF23 a iFGF23 s glomerulární filtrací odhadovanou z koncentrace cystatinu C (eGFR cystatin C). (cFGF23: Spearman $r = -0,499$, $P = 0,0014$, iFGF23: Spearman $r = -0,491$, $P = 0,0017$). Korelace FGF23 s kreatininem eGFR odhadovaná ze vzorce CKD-EPI nebyla v naší studii významná. Podobně Witteveen *et al.* nenalezli významný vztah mezi koncentracemi iFGF23 a glomerulární filtrací (odhadovaný podle vzorce MDRD) u pacientů s pHPT (Witteveen, *et al.* 2012). Koncentrace cFGF23 v plazmě významně poklesly jeden den po operaci ve srovnání s hodnotami před operací (obrázek 32). Plazmatické koncentrace iFGF23 vykázaly významnější pokles, koncentrace iFGF23 měřené 1 den po paratyreoidektomii byly dokonce nižší než deklarovaný detekční limit soupravy (1,5 pg/mL). Strmější pokles pooperačních koncentrací iFGF23 je způsoben jeho kratším biologickým poločasem (intaktní FGF23 má kratší biologický poločas minut, zatímco cFGF23 má poločas 22–94 minut) (Rifai, *et al.* 2018; Smith, *et al.* 2014) a koreloval s publikovanou hodnotou referenční změny (RCV) (RCV pro iFGF23 = 50% a RCV = 25% pro cFGF23) (Smith, *et al.* 2014). Kratší biologický poločas iFGF23 může naznačovat důležitý diagnostický potenciál pro sledování perioperačních a pooperačních změn ve fosfátovém metabolismu. Nízká stabilita (rychlá proteolýza nastávající za méně než 4 minuty s výraznou degradací v rozmezí 24–60 % za 4 hodiny) s významnou denní variací (25% pokles během dne s maximy ráno) se uvádí jako limitující faktor pro použití intaktního FGF23 jako dalšího markeru fosfátové homeostázy (Smith, *et al.* 2014; Smith, *et al.* 2012). PTH a iFGF23 mají podobný poločas (poločas PTH je 3–4 minuty) (Rifai, *et al.* 2018), nicméně hladiny PTH rychle poklesly v důsledku mechanického odstranění adenomu. FGF23 se snižoval s časovým zpožděním v reakci na snížený PTH. Různé biologické poločasy iFGF23 a cFGF23 také přispívají k poklesu časového zpoždění FGF23. Dokázali jsme, že hladiny FGF23 nebyly ovlivněny věkem a pohlavím. Data na obrázku 32 a 33 ukazují, že ke snížení hodnot FGF23 nedochází během operace na rozdíl od hodnot PTH, které se snižují okamžitě (10 minut) po paratyreoidektomii. Podobné výsledky publikovali i Kobayashi *et al.*, kteří zjistili významně snížené

koncentrace cFGF23 u pacientů s pHPT první den po paratyreoidektomii (Kobayashi, *et al.*, 2006). Naproti tomu Yamashita *et al.* nepozorovali rozdíly v postparatyreoidektomických hladinách iFGF23 v séru, zatímco hladiny vápníku byly normalizovány. Měřili však FGF23 šestý pooperační den a předoperačně pozorovali pozitivní korelaci iFGF23 s hladinami PTH a kalcia v séru a negativní korelaci iFGF23 s hladinami fosfátu v séru a 1,25(OH)₂D (Yamashita, *et al.*, 2014). Bilha *et al.* sledovali pacienty s hypovitaminózou vitaminu D a s pHPT a potvrdili, že předoperační koncentrace cFGF23 v séru byly v normálním rozmezí a také že jeden den po operaci zůstaly nezměněny (Bilha, *et al.* 2020). Někteří pacienti v této kohortě byli prospektivně sledováni až 12 měsíců po operaci, a to navzdory normalizaci PTH a Ca a suplementaci vitaminu D a konstantním hladinám cFGF23. Autoři také dospěli k závěru, že vyhodnocení a dynamika FGF23 nejsou informativní ohledně závažnosti pHPT. Witteveen *et al.* uváděli významný vztah mezi hladinami PTH a FGF23 u pacientů s pHPT a jejich výsledky naznačují, že zvýšení hladin FGF23 u pacientů s pHPT by mohl být adaptační mechanismus k vyrovnání zvýšení hladin 1,25(OH)₂D, který je vyvolán zvýšeným PTH (Witteveen, *et al.* 2012). Hassani *et al.* Popisují zvýšenou koncentraci (1,25(OH)₂D u pacientů s pHPT. Prokázali také pozitivní korelaci FGF23 s 1,25(OH)₂D před operací a po operaci (24 hodin a 1 týden po operaci), neprokázali však významné korelace mezi FGF23, vápníkem, fosfátem a PTH. Zjistili jsme, že hladiny fosfátů v plazmě se zvýšily a hladiny vápníku v séru se snížily 1 den po operaci (viz tabulka 6). Zvýšení plazmatického fosfátu korelovalo se snížením FGF23 (cFGF23: Spearman $r = -0,253$, $P = 0,0065$, iFGF23: Spearman $r = -0,245$, $P = 0,0085$) a pooperační pokles celkového vápníku koreloval se snížením hodnot FGF23 (cFGF23: Spearman $r = 0,5982$, $P = 0,0008$, iFGF23: Spearman $r = 0,41$, $P = 0,02$). Tato zjištění naznačují důležitou roli FGF23 při udržování minerální homeostázy. Stejně korelace potvrzují i další autoři (Yamashita, *et al.* 2014). (Nilsson, *et al.*, 2016). Naopak Bilha *et al.* (Bilha, *et al.* 2020) a Hassani *et al.* (Hassani, *et al.*, 2020) tyto korelace nepotvrdili. Řada studií popisuje významnou roli FGF23 v kostním metabolismu (Witteveen, *et al.* 2012; Komaba, *et al.*, 2009; Rodriguez, *et al.*, 2012; Grabner, *et al.*, 2017). Hodnotili jsme vztah cFGF23 a iFGF23 s P1NP jako důležitým biomarkerem tvorby kostí a nenašli jsme významnou korelaci. Předoperační hodnoty P1NP nalezené v naší studii byly v horní oblasti referenčního rozmezí, což odpovídá zvýšenému kostnímu obratu u pacientů s pHPT. Výhodou předkládané studie je stanovení iFGF23 a cFGF23. Všechny citované studie skutečně určují buď FGF23, nebo cFGF23. Ačkoli se pokles iFGF23 jeden den

po paratyroidektomii jeví jako klinicky významnější než pokles cFGF23, výše uvedené nízké stability a denní variace se zdají být omezujícími faktory pro použití iFGF23 při udržování fosfátové homeostázy.

Poslední studie se zabývala využitím kyseliny hyaluronové při sledování pacientů s gonartrózou kolene. Recentní studie ukazují zásadní význam kyseliny hyaluronové v posouzení závažnosti postižení. Koncentrace kyseliny hyaluronové korelují s mírou postižení (Buhren, *et al.*, 2016; Gupta, *et al.*, 2019; Temple-Wong, *et al.*, 2016).

Je prokázána také významná negativní závislost kyseliny hyaluronové na věku (Temple-Wong, *et al.*, 2016). Naše výsledky jsou od těchto výsledků odlišné, neboť jsme neprokázali závislost na věku ani významnou korelaci s radiologickým stupněm prokázané gonartrózy. Tuto odlišnost lze vysvětlit jednak značnou věkovou heterogenitou sledovaného souboru (ve velké většině se jednalo o pacienty starší 50 let – 63 z celkových 68 pacientů). Druhým vysvětlením týkajícím se nevýznamného rozdílu v synoviálních koncentracích kyseliny hyaluronové může být skutečnost, že diagnostický kit použitý pro stanovení kyseliny hyaluronové neposkytuje přesnou informaci o velikosti a molekulové hmotnosti stanovovaného fragmentu. Výše uvedené studie popisují významné korelace různých velikých fragmentů kyseliny hyaluronové (molekulová hmotnost 0,8–20 kDa) s klinicky prokázanými formami onemocnění (Blewis, *et al.*, 2007; Buhren, *et al.*, 2016; Temple-Wong, *et al.*, 2016). Vysokomolekulární formy mají protektivní účinky, zatímco nízkomolekulární formy vykazují významnou prozánětlivou, angiogenní a imunostimulační aktivitu. I přes značné rozpětí hodnot (14–5000 mg/L) se synoviální koncentrace kyseliny hyaluronové v naší studii významně neodlišovaly od hodnot publikovaného referenčního rozmezí 1500–3200 mg/L (Palmieri, *et al.*, 2017). Pacienti, kteří podstoupili artroskopii, mají významně vyšší koncentrace synoviální HA oproti pacientům s implantací kolenní endoprotézy (2581 vs 1763 mg/L, $p = 0,01$), nicméně korelace hodnot HA v obou skupinách s RTG nálezy není významná. Vyšší koncentrace synoviální HA u pacientů po artroskopii oproti pacientům s implantací totální endoprotézy lze vysvětlit tím, že pacienti, kterým byla provedena artroskopie, byli významně mladší než pacienti, kteří podstoupili totální endoprotézu (průměrný věk 62 let oproti 69 let, $p = 0,03$, Mannův Whitneyův U test). Pacienti s TEP ve větší míře vykazovali omezení hybnosti a trvalé klidové a noční bolesti klasifikované dle kritérií VAS (Williamson, Hoggart, 2005). Pacienti podstupující artroskopii vykazovali předoperačně nižší skóre bolesti – rozmezí VAS 2–5/10, oproti pacientům k TEP, kteří vykazovali zvýšené skóre v rozmezí VAS 4–7/10. Závažnost onemocnění lze často

posoudit podle fyzikálně chemických kritérií (viskozita a viskoelasticita). Kyselina hyaluronová je významným ukazatelem viskozity a viskoelasticity. Nízké koncentrace kyseliny hyaluronové jsou spojeny s nízkou viskoelasticitou a viskozitou, a tedy se závažností onemocnění (Blewis, *et al.*, 2007; Buhren, *et al.*, 2016; Temple-Wong, *et al.*, 2016). Recentní studie ukazují, že alterace osmotických podmínek, konkrétně hypoosmotický stres v synoviální tekutině i chondrocytech, významně snižuje viskoelastické vlastnosti prostředí (Guilak, *et al.*, 2002; Gupta, *et al.*, 2019; Tamer, 2013). Tamer *et al.* (Tamer, 2013) popisují exponenciální vztah mezi koncentrací hyaluronanu a osmotickým tlakem a zmiňují také fakt, že významné změny v koncentracích HA vedou ke změnám osmotického tlaku. Osmotický tlak v buňkách lze charakterizovat prostřednictvím vyšetření osmolality. V naší studii jsme prokázali významnou pozitivní korelaci koncentrací HA a osmolality v synoviální tekutině (Speramanův $r = 0,29$, $P = 0,02$, zek 36). Tato korelace ukazuje možnost využití kyseliny hyaluronové jako ukazatele viskozity a viskoelasticity k posouzení klinického stavu pacientů s artrózou.

5. ZÁVĚRY

Koncentrace thymidinkinázy 1 v séru jsou zvýšené u pacientů s karcinomem prostaty. TK1 se jeví jako slibný doplňkový diagnostický marker při diagnostice rakoviny prostaty.

Koncentrace mindinu jsou sniženy u pacientů s karcinomem prostaty. Mindin se jeví jako vhodný diagnostický marker užitečný při diagnostice rakoviny prostaty.

Koncentrace FGF23 významně poklesly u pacientů po paratyreoidektomii. Pokles koreloval s nárůstem hladiny anorganických fosfátů. FGF23 slouží jako vhodný ukazatel kalciofosfátového metabolismu u pacientů s primární hyperparatyreózou.

Koncentrace kyseliny hyaluronové u pacientů s gonartrózou, podstupující artroskopický výkon, jsou zvýšené oproti skupině pacientů podstupující operaci totální endoprotézy kolene.

Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině nekoreluje se závažností onemocnění posuzovanou dle radiologických kritérií (RTG klasifikace dle Kellgrena a Lawrence).

Koncentrace hyaluronové kyseliny v synoviální tekutině koreluje se zvýšeným Osmotickým tlakem, a mohou tedy být doplňkovým ukazatelem závažnosti artrózy.

6. SOUHRN

Imunochemické metody jsou důležitým pomocníkem klinických lékařů i odborníků v biomedicínském výzkumu. Předností imunochemických metod je jejich vysoká citlivost a přesnost. Cílem práce bylo využít imunochemických metod ke stanovení biomarkerů nádorových a degenerativních onemocnění. V práci jsme se zaměřili na vybrané kandidátní biomarkery karcinomu prostaty (Annexin, SPINK-1, TIMP, Chromogranin A, Endoglin, Mindin, Thymidinkináza-1) a jejich možný přínos a využití pro diagnostiku karcinomu prostaty, sledovali jsme perioperační dynamiku FGF23 u pacientů s primární hyperparatyreózou a dále bylo naším cílem posoudit možnosti využití kyseliny hyaluronové v diagnostice degenerativních onemocnění kloubů (gonartróza kolene).

Zjistili jsme, že koncentrace thymidinkinázy 1 v séru jsou zvýšené u pacientů s karcinomem prostaty. TK1 se jeví jako slibný doplňkový diagnostický marker při diagnostice rakoviny prostaty. Dále jsme našli korelaci mindinu u pacientů s karcinomem prostaty, u těchto pacientů byly prokázány také snížené koncentrace Thymidinkinázy 1.

Koncentrace FGF23 významně poklesly u pacientů po paratyreoidektomii. Pokles koreloval s nárůstem hladiny anorganických fosfátů. FGF23 slouží jako vhodný ukazatel kalciofosfátového metabolismu u pacientů s primární hyperparatyreózou a lze ho využít jako další marker pro sledování stavu pacientů po operaci.

Koncentrace kyseliny hyaluronové u pacientů s gonartrózou, podstupující artroskopický výkon, jsou zvýšené oproti skupině pacientů podstupující operaci totální endoprotézy kolene. Dále jsme zjistili, že koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině nekorelují se závažností onemocnění posuzovanou dle radiologických kritérií (RTG klasifikace dle Kellgrena a Lawrence), ale koncentrace hyaluronové kyseliny v synoviální tekutině korelují se zvýšeným osmotickým tlakem, a mohou tedy být doplňkovým ukazatelem závažnosti artrózy.

7. SUMMARY

Immunochemical methods are an important aid for clinicians and experts in biomedical research. The advantage of immunochemical methods is their high sensitivity and accuracy. The aim of the work was to use immunochemical methods to determine biomarkers of cancer and degenerative diseases. We focused on selected candidate biomarkers of prostate cancer (Annexin, SPINK-1, TIMP, Chromogranin A, Endoglin, Mindin, Thymidine Kinase-1) and their possible contribution and use for the diagnosis of prostate cancer, we monitored the perioperative dynamics of FGF23 in patients with primary hyperparathyroidism and our goal was to assess the possibilities of using hyaluronic acid in the diagnosis of degenerative joint diseases (gonarthrosis of the knee).

We found that serum thymidine kinase 1 levels are elevated in patients with prostate cancer. TK1 appears to be a promising complementary diagnostic marker in the diagnosis of prostate cancer. We also found a correlation of mindin in patients with prostate cancer and the concentrations of thymidine kinase 1 was reduced also in these patients.

FGF23 levels decreased significantly in patients after parathyroidectomy. The decrease correlated with an increase in the level of inorganic phosphates. FGF23 serves as a suitable indicator of calcium-phosphate metabolism in patients with primary hyperparathyroidism and it can be used as another marker to monitor the condition of patients after surgery.

Hyaluronic acid concentrations in patients with gonarthrosis undergoing arthroscopic surgery are increased compared to the group of patients undergoing total knee arthroplasty. We also found that hyaluronic acid concentrations in synovial fluid do not correlate with disease severity as assessed by radiological criteria (x-ray classification of Kellgren and Lawrence), but hyaluronic acid concentrations in synovial fluid correlate with increase osmotic pressure and may therefore be an additional indicator of osteoarthritis severity.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Články v časopisech s IF

Hanousková, L.¹, Řezáč, J.², Veselý, Š.², Průša, R.¹, Kotaška K.¹ Diagnostic benefits of mindin as a prostate cancer biomarker. *Journal of Medical Biochemistry*, 2019, vol. 38, no.1., p. 1 – 4, ISSN 1452-8258, IF = 2.00

Hanousková, L.¹, Řezáč, J.², Veselý, Š.², Průša, R.¹, Kotaška, K.¹ Thymidine Kinase-1 as Additional Diagnostic Marker of Prostate *Cancer Clin. Lab.* 2020; no. 66, p.1045-1049, ISSN: 1433-6510, IF = 0.955

Kotaška, J.¹, Hanousková L.², Průša R.², Trč T.¹, Kotaška K.², Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině jako ukazatel závažnosti a stupně postižení u pacientů s gonartrózou *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 2021, vol. 88, no. 2, p. 85 -88, IF = 0,256

Články v časopisech bez IF

Jurovčík, M.¹, Borský, J.¹, Dytrych, P.¹, Černý, M.³, Velemínská, J.⁴, Jaklová, L.⁴, Kotaška, K.², Hanousková, L.², Skřivan, J.¹ První příznaky sekretorické otitidy u novorozenců operovaných pro rozštěpovou vadu – záchyt v desetiletém souboru, *Otorinolaryngol Foniatr*, 2020, no. 69, p. 55 – 61, ISSN 1210-7867

Abstrakta ve sbornících z konference

1. Mezinárodní (anglicky)

Řezáč, J.¹, Veselý, S.¹, Hanousková, L.², Kotaška, K.², Babjuk, M.¹ Serum thymidine kinase 1 level correlates with the presence of prostate cancer, 2018 - The 18th Central European Meeting (CEM)

Hanousková, L.¹, Kotaška, K.¹, Průša, R.¹, Řezáč, J.², Veselý, Š.² New biomarkers of prostate cancer. *Clinica Chimica Acta*, 2019;493, S119 – EuromedLab Barcelona

Hanousková, L.¹, Kotaška, K.¹, Průša, R.¹, Řezáč, J.², Veselý, Š.² Diagnostic benefit of mindin as prostate cancer biomarker. *Clinica Chimica Acta*, 2019;493, S117 – EuromedLab Barcelona

2. Celostátní

Hanousková, L.¹, Řezáč, J.², Veselý, Š.², Kotaška, K.¹ Biochemické markery karcinomu prostaty, Symposium FONS 2018

Řezáč J.^{1,3}, Hanousková L.², Kotaška K.², Veselý Š.¹ Thymidinkináza 1 – nový diagnostický tumormarker karcinomu prostaty?, 65. výroční konference ČUS ČLS JEP 2019

Hanousková L.^{1,2}, Iblova M.¹, Kotaška K.² Vyšetření volných lehkých řetězců v diagnostice mnohočetného myelomu – kazuistika, Program a sborník sympozia FONS 2020, ISBN: 978-80-87436-18-9

Hanousková L.¹, Kotaška J.², Průša R.¹, Trč T.², Kotaška K.¹ Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině jako ukazatel závažnosti a stupně postižení u pacientů s gonartrózou Program a sborník sympozia FONS 2020, ISBN: 978-80-87436-18-9

Ostatní

Hanousková, L. Zavádění nového vyšetření – volné lehké řetězce kappa a lambda, Statim: dvouměsíčník pro zaměstnance skupiny AeskuLab. Praha: AeskuLab k.s., 5, 2018, s.5

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABALLAY, A a HERMANS, M H, Neodermis formation in full thickness wounds using an esterified hyaluronic acid matrix. *Journal of Burn Care and Research*. 2019, vol. 40, no. 5, p. 585-589.

AMLING , C L, Biochemical recurrence after localized treatment. *The Urologic clinics of North America.*, 2006, vol. 33, no. 2, p. 147-159.

AVERY, G, Proč se mít na pozoru před biotinem? *Bulletin FONS.* , 2018, no. 1, p. 36-37.

AYDIN, S, A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptidp.* 2015, vol. 4, no.15, p.72.

BARTŮŇKOVÁ, J and PAULÍK, M, Vyšetřovací metody v imunologii., 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

BICKERS, B and AUKIM-Hastie, C, New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer - *The post PSA era. Anticancer research*. 2009, vol. 29, p. 3289-3298.

BILHA, S C, *et al.*, FGF23 and primary hyperparathyroidism: is there a link? . *Endokrinol Pol.* . 2020, vol. 71, no. 4, p. 306-312.

Bio-Rad. 2020. Bio-Rad. [Online] 11. 1 2020. [Citace: 11. 1 2020.] <https://www.bio-rad-antibodiep.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formatp.html>.

BLAU, J a COLLINS, M, The PTH-Vitamin D-FGF23 axip. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorderp.*, 2015, vol. 16, p. 165-174.

BLEWIS, M E, *et al.*, A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured jointp. *Eur Cell Mater.*, 2007, vol. 13, p. 26-39.

BUHREN, B A, *et al.*, Hyaluronidase from clinical applications to molecular and cellular mechanism. *Eur J Med Rep.*, 2016, vol. 21, no. 5, p. 1-6.

BURTISs, C A, *et al.* Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnosticp. e-book : *Elsevier Health Sciences*, 2012. ISBN: 978-03-2335-921-4

COLON, P J and GREENE, D N, Biotin interference in Clinical Immunoassayap. *The Journal of Applied Laboratory Medicine.*, 2018, vol.2, no. 6, p. 941-951.

CROWTHER, J R, ELISA: *Theory and practice*. New Jersey, Humana Press , 1995. ISBN: 978-1-59259-529-7.

DAUSSANT, J, *et al.*, *Introduction to immunochemical techniques for medical diagnosis, food quality control and enviromontal testing*. Praha: Institute of chemichal technology Prague, 2007, ISBN: 978-80-7080-641-8

DIENTSBIER, Z *et al.*, *Nukleární medicína*. Praha.1. vyd., Avicenum, 1971.

EAU. prostate cancer guideline. uroweb. [Online] [Citace: 14. 02 2021.] <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/?fbclid=IwAR0Hvxn2LK4mWWGT6HShxva2qbgE-qmvYI1ih-b7VopDyMbl5WdZr74NPIU#4>.

FIALOVÁ, L, *et al.*, Přehled imunoanalytických metod ke stanovení tripletu biomarkerů Alzheimerovy nemoci v mozkomíšním moku a v krvi. *Chem. Listy.*, 2020, vol. 114, p. 537-544.

FILELLA, X, *et al.*, Comparasion of several combinations of free, complexed, and total PSA in the diagnosis of prostatce cancer in patients with urological symptomp. *Adult urology*, 2004, vol. 63, p. 1100-1104.

FUJITA, K, *et al.*, Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. *International Journal of Cancer.*, 2008, no. 3.

GLADKOVA, E V, The role of matrix metalloproteinases in early and late gonarthrosis manifestation. *Physiology and Pathophysiology*. 2020, vol. 9, no. 3.

GONG, Y, *et al.*, Elevated Circulating Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1) levels are associated with neuroendocrine differentiation in castration resistant prostate cancer. *The Prostate*. 2015, vol. 75, p. 616-627.

GRABNER, A, *et al.*, Fibroblast Growth Factor 23: *Mineral Metabolism and Beyond*. *Contrib Nephrol*. 2017, 190, p. 83-95.

GREGG J L, *et al.*, Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. *BMC Cancer* 2010, vol. 10, no.165.

GROZAVU, C and PANTILE, D, Primary hyperparathyroidism through an ectopic parathyroid adenoma . *Chirurgia*. 2016, vol,111, no. 2, p. 156-160.

GUILAK, F, *et al.*, The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes. *Biophys J*. 2002, vol. 82, p. 720-727.

GUIBAULT, G G., Practical Fluorescence., New Orleans: Marcel Dekker, Inc., 1990. Second Edition.. ISBN 9780824783501.

GUPTA, F, *et al.*, Hyaluronic Acid Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory . *Front Vet Sci.*, 2019, vol. 6, no. 192, p. 1-24.

HABRDOVÁ, V, *et al.*, Výhody, nevýhody a úskalí imunochemických analytických metod v toxikologické praxi. *Klin. Biochem. Metab.* 2009, vol 17, no. 38, p. 233-238.

HANOUSKOVÁ, L, *et al.*, Thymidin kinase-1 as additional diagnostic marker of prostate cancer. *Clin.Lab*. 2020, vol. 66, p. 1045-1049.

HANOUSKOVÁ, L, *et al.*, Diagnostic benefits of mindin as a prostate cancer biomarker. *Journal of Medical Biochemistry*. 2019, no. 38, p.1-4

HASSANI, S, *et al.*. Evaluation of Serum Level of FGF23 and 1,25(OH)2D3 in Primary Hyperparathyroidism Patients Before and After Parathyroidectomy. *Int J Gen Med.*, 2020, vol. 13, p. 289-295.

HERMANS, J, *et al.*. The effectiveness of high molecular weight hyaluronic acid for knee osteoarthritis in patients in the working age: a randomised controlled trial. *BMC Musculoskeletal Disorderp.* 2019, vol. 20, no. 196.

HORÁČKOVÁ, M, *et al.* Vyšetřování tubulární resorpce fosfátů u pacientů s chronickým onemocněním ledvin, *Vnitř. Lék.* 2015, vol. 61, no. 12, p. 1034 -1038

HOŘEJŠÍ, V and BARTUŇKOVÁ, J, *Základy imunologie.* Praha: Triton, 2017. 6. přepracované vydání. ISBN: 978-80-7553-250-3

HRDÝ, P and NOVOSAD, P, Nové poznatky o funkci vitamínu D. *Prakt.lékáren*, 2015, vol. 11, no. 2, p. 54-57.

CHROMÝ, V and FISCHER, J, *Analytická chemie v klinické biochemii.* Brno, MU Brno, 2000. ISBN:80-210-2363-5.

IMMUNOTECH. 2017. beckmancoulter.com. beckmancoulter. [Online] 23. 08 2017. [Citace: 4. 11 2020.] https://www.beckmancoulter.com/download/file/phxPI-A15728-A5446401-EN_US/PI-A15728-A5446401?type=pdf. PI-A15728-A54464-01.

—. 2018. beckmancoulter.com. beckmancoulter. [Online] 30. 8 2018. [Citace: 4. 11 2020.] https://www.beckmancoulter.com/download/file/phxPI-IM194805-EN_US/PI-IM194805?type=pdf. PI-IM1948-05.

JABOR, A and FRANEKOVÁ, J, *Principy interpretace laboratorních výsledků.* Praha : Roche p.r.o., 2013. ISBN 978-80-260-5094-0.

JACQUILLET, G and UNWIN, R J, Physiological regulation of phosphate by vitamin D, parathyroid hormone (PTH) and phosphate (Pi). *Europen Journal of Physiology.*, 2019, vol. 471, no.1, p. 83-98.

JAGARLAMUDI, K K and SHAW, M, Thymidine kinase 1 as a tumor bio-marker: technical advances offer new potential to an old biomarker. *Biomark Med.* 2018, vol. 12, no. 9, p. 1035-1048.

JAGARLAMUDI, K K, *et al.*, Breast and prostate cancer patients differ significantly in their serum Thymidine kinase 1 (TK1) specific activities compared with those hematological malignancies and blood donors: implications of using serum TK1 as a biomarker. *BMC Cancer.* 2015, vol. 15, no. 66.

JAGARLAMUDI, K K, *et al.*, The combination of AroCell TK 210 ELISA with prostate healthy index or prostate-specific antigen density can improve the ability to differentiate prostate cancer from noncancerous conditions. *The Prostate.* 2019, vol. 79, no. 8, p. 856-863.

JEON, S, *et al.*, Modeling of homogeneous cloned enzyme donor immunoassay. *Analytical Biochemistry.* 2004, vol. 333, no. 1, p. 136-147.

JIN, Ch, *et al.*, Elevated spondin-2 expression correlates with progression and prognosis in gastric cancer. *Oncotarget.* 2017, vol. 8, no. 6, p. 10416-10424.

JOKERS, J V, *et al.*, A Magnetic Bead-Based Sensor for the Quantification of Multiple Prostate Cancer Biomarkers, 2015, *PLoS ONE*, vol.10, no.9

KAPLAN, O, *et al.*, Současné trendy diagnostiky karcinomu prostaty. *Onkologie.* 2010, vol. 4, no. 2, p. 68-71.

KARLÍKOVÁ, M and TOPOLČAN, O, Principy imunoanalytických metod. [Online] 2013. [Citace: 3. 11 2020.] <https://docplayer.cz/26116079-Principy-imunoanalytickych-metod-pro-mediky.html>.

KAUŠITZ, J, *et al.*, Biomarkery v onkologii. Plzeň: Tribun, 2014. ISBN 978-80-263-0820-1.

KLEČKA, J, *et al.*, Nádorové markery karcinomu prostaty. *Ces Urol.*, 2008, vol. 12, no. 3, p. 173-185.

KOBAYSHI, K, *et al.*, Regulation of plasma fibroblast growth factor 23 by calcium in primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2006, vol. 154, no. 1, p. 93-99.

KODÍČEK, J and VALENTOVÁ, O. Laboratorní techniky biochemie. Praha: VŠCHT, 2006. 1.vyd. ISBN 80-7080-586-2

KOIVUNEN, M E and KROSGRUD, R L, Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine*, 2006. vol. 37, no:8, p. 490 - 497.

KOMABA, H and FUKAGAWA, M, FGF23: a key player in mineral and bone disorder in CKD. *Nefrologia.* 2009, vol. 29, no. 5, p. 392-396.

KOMÁREK, L, *et al.*, Podpora zdraví a zdravotní politika v prevenci nádorových onemocnění. Praha :GEOPRINT, 2002. vyd.1.

KOPECKÝ, J, *et al.*, Přínos [-2]pro PSA a PHI pro diagnostiku karcinomu prostaty. *Urologie pro praxi.* 2015, vol. 16, no. 3, p. 106-108.

KORNILOV, N N and DENISOV, A A, A paradigm of early gonarthrosis: a review of the current diagnostic and treatment options (Part 1). *Terapevticheskii Arkhiv.* 2017, vol. 89, no. 12, p. 238-243.

KOTAŠKA, J a TRČ, T, Kyselina hyaluronová - charakteristika, její význam a klinické aplikace. *Ortopedie.* 2018, vol. 5, no. 5, p. 221-225.

KOUDA, P, Moderní analytické metody. Ostrava , Pavel Kouda, 2003. ISBN: 80-86369-07-2.

KUMAR, M, *et al.*, Biomarkers of disease in medicine. *Current trends in science.* 2009, vol.3, 403-417.

- LAPČÍK, O, 50 let radioimunoanalýzy. *Chem. listy*. 2009, no. 103, p. 847-869
- LEE, J. Bioluminescence: the First 3000 Years (Review). *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2008, vol. 3, p. 194-205.
- LEE J E, *et al.*, Circulating Levels of Vitamin D and Colon and Rectal Cancer: The Physicians' Health Study and Meta-analysis of Prospective Studies. *Cancer Prev Res* 2011, vol. 4, no.5, p. 735–743.
- LEQUIN, R M, Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005, vol. 51, no. 12. p. 2415-2418
- LI, Qi, *et al.*, Altered staining patterns and expression level of Engrailed-2 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer predict prostatic disease progression. *BMC cancer*. 2020, vol. 20, no. 555.
- LI, S, *et al.*, Serum thymidine kinase 1 is associated with Gleason score of patients with prostate carcinoma. *Onco. Lett.* 2018, vol. 16, no. 5, p. 6171-6180.
- LIN, A V, Methods in Molecular Biology: Direct ELISA. New York : Humana Press, 2015. ISBN : 978-1-4939-2742-5.
- LIU, Y, *et al.*, Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene*. 2002, vol. 21, p. 8272 - 8281
- LUCARELLI, G, *et al.*, Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. *J. Urol.* 2013, vol. 190, no. 6, p. 2271-2277.
- MA, J, *et al.*, Targeted knockdown of EGR-1 inhibits IL-8 production and IL-8 mediated invasion of prostate cancer cells through suppressing EGR-1/NF-kappaB synergy. *J Biol Chem*. 2009, vol. 284, no. 50, p. 34600-34606.

MADEO, B, *et al.*, The calcium-to-phosphorus (Ca/P) ratio in the diagnosis of primary hyperparathyroidism and hypoparathyroidism: a multicentric study. *Endocrine*. 2020, vol. 68, no. 3, p. 679-687.

MAK, N T, *et al.*, Intraoperative parathyroid hormone measurement during parathyroidectomy for treatment of primary hyperparathyroidism: When should you end the operation? *The American Journal of Surgery*. 2020, vol. 219, no. 5, p. 785-789.

MAZIERSS, B, *et al.*, Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH Cohort. *Ann Rheum Dis*. 2006, vol. 65, no. 3, p. 354-359.

McCARTY, W J, *et al.*, The biophysical mechanisms of altered hyaluronan concentration in synovial fluid after anterior cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum*. 2012, vol. 64, no. 12, p. 3993-4003.

MING, F, *et al.*, Development of a DAS-ELISA for detection of H9N2 avian influenza virus. *Journal of Virological Methods*, 2019. no. 263, p. 38-43.

NIEDWOROK, Ch, *et al.*, Serum Chromogranin A as a Complementary Marker for the Prediction of Prostate Cancer-Specific Survival. *Pathol. Oncol. Rep*. 2017, vol. 23, no. 3, p. 643-650.

NILSSON, I, *et al.*, FGF23, metabolic risk factors, and blood pressure in patients with primary hyperparathyroidism undergoing parathyroid adenectomy. *Surgery*. 2016, vol. 159, no. 1, p. 211-217.

ONU, I, *et al.*, Efficacy of intra-articular hyaluronic acid injections in the rehabilitation programme of knee osteoarthritis. *Balneo Research Journal*. 2019, vol. 10, no. 3, p. 225-230.

PALMIERI, B, *et al.*, Synoviology: a new chapter entitled to joints care. *Asian Journal of Medical Sciences*. 2017, vol. 8, p. 1-10.

PARRA, E, *et al.*, Down-regulation of Egr-1 by si RNA inhibits growth of human prostate carcinoma cell line PC-3. *Oncol Rep.* 2009, vol. 22., no. 6, p. 1513-1518.

PAVELKA, K, *et al.*, Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004, vol. 12, no. 4, p. 277-283.

PerkinElmer. 2007. PerkinElmer. PerkinElmer. [Online] 2007. [Citace: 5. 11 2020.] www.perkinelmer.com.

PIKNER, R, *et al.*, Markery kostního obratu u osteoporózy: společné stanovisko k jejich využití Společnosti pro metabolická onemocnění skeletu České lékařské společnosti J. E. Purkyně a České společnosti klinické biochemie České lékařské společnosti J. E. Purkyně. *Clinical Osteology.* 2020, vol. 25, no. 2, p. 65-82.

QIAN, X, *et al.*, Spondin-2 (SPON2), a more prostate cancer-specific diagnostic biomarker. *PLoS One.* 2012, vol. 7, no. 5, e37225.

RACEK, J, 2006. Klinická biochemie. Praha: Galén, 2.vyd., 2006. ISBN: 80-7262-324-9.

REIS, S T, *et al.*, Loss of TIMP-1 immune expression and tumor recurrence in localized prostate cancer. *Int Braz J Urol.* 2015, vol. 41, no. 6, p. 1088-1095.

RIFAI, N, *et al.*, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular. St.Louis : Elsevier, 2017. 6 ed. ISBN: 978-0323-3592-14

RODDAM, A W, *et al.*, Prostate-specific antigen: bias and molarity of commercial assays for PSA in use in England. *Ann Clin Biochem.* 2006, vol. 45, no. 1, p. 35-48.

RODRIGUEZ, M, *et al.*, FGF23 and mineral metabolism, implications in CKD-MBD. *Nefrologia.* 2012, vol. 32, no. 3, p. 275-278.

Roche. 2001. Cobas e 411 analyzer Operator's manual. Hitachi Hig-Technologies Corporation, 2001. Version 1.0.

ROMERO, D, *et al.*, Endoglin Regulates Cancer–Stromal Cell Interactions in Prostate Tumorp. *Cancer Research*. 2011, vol. 71, no. 10., p. 3482 - 3493

SALLES, BEATRIZ C P, *et al.*, Leishmania infantum mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016, vol. 87, no. 3, p. 219-225

SHYH-HAN, T, *et al.*, Prognostic features of Annexin A2 expression in prostate cancer. *Pathology*. 2021, vol.53, no. 2, p. 205-213.

SCHNEIDERKA, P *et al.*, Kapitoly z klinické biohemie, Praha:Karolinum: Galén, 2004, 2.vyd.

SinoBiological. 2020. Principy ELISY - Sino biological. [Online] Sino Biological, 11. 01 2020. [Citace: 11. 01 2020.] <https://www.sinobiological.com/elisa-principle.html>.

SKELLEY, D P, *et al.*, Radioimmunoassay. *Clinical Chemistry*. 1973, vol. 19, no. 2, p. 146- 186

SMITH, E R, *et al.*, Biological variability of plasma intact and C-terminal FGF23 measurementp. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012, vol. 97, no. 9, p. 3357-3365.

SMITH, E R, *et al.*, Fibroblast growth factor 23. *Ann Clin Biochem*. 2014, vol. 51, no. 2, p. 203-227.

SPRINGER, D, *et al.*, Klinická a toxikologická analýza. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN: 978-80-86238-51-7.

STEJSKAL, J, *et al.*, Diagnostika karcinomu prostaty pomocí fúzní biopsie. *Ces Urol*. 2018, vol. 22, no. 2, p. 87-98.

SUCHÁNEK, M, *et al.*, Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2006, no. 1, p. 43-53.

SVOBODA, M, Identifikace a studium molekulárních biomarkerů z hlediska individualizace léčebně-preventivních strategií v onkologii. Habilitační práce. Brno: Masarykova univerzita, lékařská fakulta, 2013.

SZARVAS, T, *et al.*, Comprehensive analysis of serum chromogranin A and neuron-specific enolase levels in localized and castration-resistant prostate cancer. *BJU International*, 2020, vol. 127, no. 1, p. 44 - 55

ŠTERN, P, Nové trendy v imunochemii. *Klin. Biochem. Metab.* 2016, vol. 24, no. 4, p. 164-169.

ŠTĚPÁNKOVÁ, J, and DUSILOVÁ-SULKOVÁ S, Novinky v diagnostice a léčbě renální kostní choroby. *Interní medicína pro praxi*, 2010 vol. 12, no. 2, p. 67 - 71

TAKAHASHI, H, *et al.*, Impact of parathyroidectomy on serum FGF23 and soluble Klotho in hemodialysis patients with severe secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014, vol. 99, no. 4, p. 652-685.

TAMER, T M, Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol.* 2013, vol. 6, no. 3, p. 111-125.

TEMPLE-WONG, M M, *et al.*, Hyaluronan concentration and size distribution in human knee synovial fluid variations with age and cartilage degeneration. *Arthritis Res Thep.* 2016, vol. 18, no. 18, p.1-8.

TOMMASI, M A *et al.*, Intraoperative fall in plasma levels of intact parathyroid hormone in patients undergoing parathyroid adenomectomy. *Int J Biol Markers.* 1995, vol. 10, no. 4, p. 206-210.

TIWARI, R, *et al.*, Androgen deprivation upregulates SPINK1 expression and potentiates cellular plasticity in prostate cancer. *Nature Communications*. 2020, vol. 11, no. 384

TOMLINS, S A, The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancer. *Cancer Cell*. 2008, vol. 13, no. 6, p. 519-528.

TOSOIAN, J J, *et al.*, Association of [-2]pro PSA with Biopsy reclassification during active surveillance for prostate cancer. *The journal of Urology*. 2012, vol. 188, no. 4, p. 1131-1136.

VALÍK, D, *et al.*, Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klin. Biochem. Metab.* 2014, vol. 22, no. 43, p. 22-39.

VAŘILOVÁ, T, Stacionární fáze v afinitní chromatografii. *Chem. Listy*. 2005, no. 99, p. 570-577.

VESELÝ, Š, *et al.*, Is Engrailed-2 (EN-2) a truly promising biomarker in prostate cancer detection? *Biomarkers*. 2020, vol. 25, no. 1, p. 34-39.

VESNA, K and TOPIĆ A, Chemiluminiscence: Theory, reactions and application in the routine clinical laboratory and research. *Arhiv za farmaciju*, 2008. vol. 58 no. 4. p. 252-268.

VILLARREAL-RÍOS, E, *et al.*, Direct cost of medical care in patients with gonarthrosis. *Reumatologia Clínica*. 2019, vol. 15, no. 5, p. 277-281.

VODIČKOVÁ, V, 2010. Wikiskripta. [Online] 3. 9 2010. [Citace: 11. 1 2020.] <https://www.wikiskripta.eu/images/e/ef/IMUNOGLOBULIN.png>. cc|by|3.0|cz.

VO-DINH, T and CULLUM, B, Biosensor and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J Anal Chem*. 2000, vol. 366, no. 6, p. 540-551.

WANG, L F, *et al.*, The extracellular matrix protein mindin attenuates colon cancer prograssion by blocking angiogenesis via Egr-1-mediated regulation. *Oncogene*. 2018, vol. 37, no. 5, p. 601-15.

WEI, X *et al.* Dysregulation of the Annexin Family Protein Family IsAssociated with Prostate Cancer Progression. *American Journal of Pathology*. 2003, vol. 162, no. 1.

WIEGAND, C, *et al.*, Identification of the causative dermatophyte of tinea capitis in children attending Mbarara Regional Referral Hospital in Uganda by PCR-ELISA and comparasion with conventional mycological diagnostic methods. *Medical Mycology*. 2017, vol. 55. no. 6, p. 660-668

WILD, D, *et al.*, The Immunoassay Handbook. Oxford: Elsevier Ltd., 2013. ISBN: 978-0-08097-037-0

WILLIAMSON, A, HOGGART B, Pain: a review of three commonly used pain rating scales. *J Clin Nurs*. 2005; no. 14, p.798–804.

WITTEVEEN, J E, *et al.*, Increased circulating levels of FGF23: an adaptive response in primary hyperparathyroidism? *Eur J Endocrinol*. 2012, vol. 166, no. 1, p. 55-60.

Wu, Y, *et al.*, Enhanced FLuorescence ELISA Based on HAT Triggering Fluorescence "Turn on" with Enzyme-Antibody Dual Labeled AuNP Probes for Ultrasensitive Detection of AFP and HBsAg. *ACS Appl. Mater. Interface*. 2017, vol. 9, no. 11, p. 9369-9377

www.sekk.cz. Metrologická terminologie ve zdravotnické a analytické laboratoři. [Online] SEKK spol. p.r.o. a EURACHEM ČR. [Citace: 14. 2 2021.] <http://sekk.cz/terminologie/index.php?akce=terminologie>.

YAMASHITA, H, *et al.*, Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2014, vol. 151, no. 1, p. 55-60.

ZAJÍČKOVÁ, K, Primární hyperparatyreóza - nové klinické formy onemocnění. *Vnitřní lékařství*. 2017, vol. 63, no. 9, p. 604-608.

ZHANG, X, *et al.*, The association between SPINK1 and clinical outcomes in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*. 2017, vol. 22, no. 10, p. 3123-3130.

ZHU, C Y, *et al.*, Diagnosis and Managment of primary hyperparathyroidism. *Clinical Review and Education*. 2020, vol. 323, no. 12, p. 1186-1187.

ZIMA, T, Laboratorní diagnostika. Praha: Galén, 2013. 3. vyd., ISBN 978-80-7492-062-2.

ŽOFKOVÁ, I, Osteologie a kalcium-fosfátový metabolismus. České Budějovice: Grada, 2012. 1. vyd., ISBN 978-80-247-3919-9.