

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Využití imunochemických metod v diagnostice nádorových  
a degenerativních onemocnění**

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

**Lenka Hanousková**

Praha, 2021

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Biochemie a patobiochemie na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF a FNM Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta.

Školitel: doc. Ing. Karel Kotaška Ph.D. Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF a FNM Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta.

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

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>7</b>
2.1	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 .....	7
2.2	SLEDOVAT PERIOPERAČNÍ DYNAMIKU FGF23 U PACIENTŮ S PRIMÁRNÍ HYPERPARATHYREÓZOU ..	7
2.3	POSODIT MOŽNOSTI VYUŽITÍ KYSELINY HYALURONOVÉ V DIAGNOSTICE DEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ KLOUBŮ (GONARTRÓZA KOLENE) .....	7
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>8</b>
3.1	HLEDÁNÍ NOVÝCH BIOMARKERŮ KARCINOMU PROSTATY .....	8
3.2	SLEDOVÁNÍ PERIOPERAČNÍ DYNAMIKY FGF23 U PACIENTŮ S PRIMÁRNÍ HYPERPARATHYREÓZOU 11	
3.3	POSOUZENÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ KYSELINY HYALURONOVÉ V DIAGNOSTICE DEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ KLOUBŮ (GONARTRÓZA KOLENE) .....	13
3.4	STATISTICKÉ METODY .....	14
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>15</b>
4.1	HLEDÁNÍ NOVÝCH BIOMARKERŮ KARCINOMU PROSTATY .....	15
4.2	SLEDOVÁNÍ PERIOPERAČNÍ DYNAMIKY FGF23 U PACIENTŮ S PRIMÁRNÍ HYPERPARATYREÓZOU .	21
4.3	POSOUZENÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ KYSELINY HYALURONOVÉ V DIAGNOSTICE DEGENERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ KLOUBŮ (GONARTRÓZA KOLENE) .....	24
<b>5.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚRY</b> .....	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA</b> .....	<b>36</b>
<b>8.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>38</b>

## Abstrakt

**Úvod:** Imunochemické metody jsou důležitým pomocníkem klinických lékařů i odborníků v biomedicinském 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 (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. 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 sniženy 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 with the (mean age 68 years, range 45 – 82 years) with clinically diagnosed prostate cancer and in 30 healthy individuals with the (mean age 64 years, range: 55 – 78 years) 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 TK1 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 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

# 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 disertační 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 (stanovní kyseliny hyaluronové u pacientů s artrózou kolene).



## **2 CÍLE PRÁCE**

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

### **Konkrétně:**

- 2.1 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**
- 2.2 Sledovat perioperační dynamiku FGF23 u pacientů s primární hyperparathyreózou**
- 2.3 Posoudit možnosti využití kyseliny hyaluronové v diagnostice degenerativních onemocnění kloubů (gonartróza kolene)**

### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### 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 resekci. Vzorky pacientů a zdravých jedinců byly okamžitě zmrazeny, alikvotovány a uchovávány při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 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 1.

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 1: TNM klasifikace**

<b>T - primární nádor (stupeň založený pouze na digitálním rektálním vyšetření [DRE])</b>	
<b>TX</b>	Primární nádor nelze posoudit
<b>T0</b>	Žádný důkaz primárního nádoru
<b>T1</b>	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])
<b>T2</b>	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
<b>T3</b>	Nádor prochází prostatickou kapslí
T3a	Extrakapsulární prodloužení (jednostranné nebo dvoustranné)
T3b	Nádor napadá semenný váček (y)
<b>T4</b>	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. Patolog 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 2 (EAU, 2021).

**Tabulka 2: 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-1, 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 (CGA), TK1 v séru a SPINK-1, Endoglin, Annexin a TIMP-1 v moči metodou enzymové imunoanalýzy (ELISA).

Charakteristika metod je uvedena v tabulce 3.

**Tabulka 3: Charakteristika metod 1. studie**

<i>Analyt</i>	<i>Vyšetřovaný materiál</i>	<i>Metoda</i>	<i>Výrobce kitu</i>	<i>detekční limit</i>	<i>pracovní rozsah</i>	<i>CV (%)</i>
CGA (pg/mL)	Sérum	sendvičová ELISA	Cloud-Clone Corp., USA	13,7	31,2 - 2000	10 - 12
SPINK-1 (ng/mL)	Moč	sendvičová ELISA	Cloud-Clone Corp., USA	0,61	1,56 - 100,0	10 - 12
Endoglin (ng/mL)	sérum, moč	sendvičová ELISA	Cloud-Clone Corp., USA	0,063	0,156 - 10,0	10 - 12
Annexin (ng/mL)	moč	sendvičová ELISA	Cloud-Clone Corp., USA	0,054	0,156 - 10,0	10 - 12
TIMP-1 (pg/mL)	sérum, moč	sendvičová ELISA	RayBiotech, UK	24,69	24,69 - 18 000	10 - 12
TK1 (pmol/L)	sérum	sendvičová ELISA	LSBio, Inc., USA	0,063	0,063 - 4,0	5,3 - 8,6

**Stanovení Thymidinkinázy (TK1) - rozšířená studie**

Sérové koncentrace TK1 byly měřeny u 169 pacientů (průměrný věk 62 let, rozmezí 45 - 82 let) s rakovinou prostaty a kontrolní skupina skládající se ze 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).

**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**

### ***3.2.1. Charakteristika pacientů a metod***

#### **Odběr vzorků:**

Vzorky byly odebrány do zkumavky s K<sub>3</sub>EDTA. 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 hyperparatyreoidismem 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 tyreoidektomií. 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 nefrektomií v důsledku nefroblastomu. U tří pacientů byla provedena opakovaná paratyreoidektomie, neboť při první operaci nedošlo k úplné excizi adenomu. U 37 pacientů nebylo zaznamenáno postižení ledvin, koncentrace kreatininu v plazmě byla v rozmezí 25 do 92  $\mu\text{mol/L}$ , jeden pacient po nefrektomií způsobenou nefroblastomem měl zvýšenou hladinu kreatininu v plazmě 112,3  $\mu\text{mol/L}$  a eGFR (CKD-EPI) = 118,37 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>.

**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)**

#### ***3.3.1 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 1mL zkumavek a zamrazeny na -80°C do doby, než byla provedena analýza. Bezprostředně před analýzou byly alikvotované vzorky ředěny PBS puftrem 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 4.

**Tabulka 4: Výsledky Annexin, SPINK-1, TIMP, Chromogranin A, Endoglin, TK1**

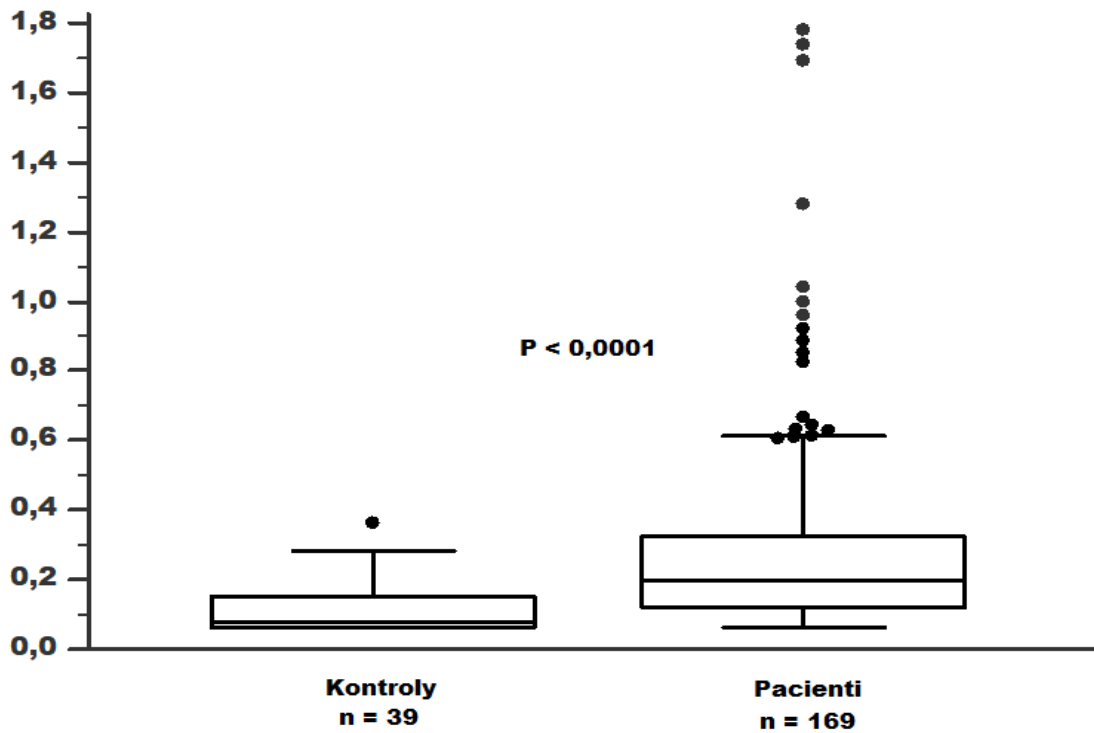
<i>Biomarker</i>	<i>Kontrolní skupina (n = 30)</i>	<i>Pacienti (n = 58)</i>	<i>P value</i>	<i>AUC</i>
S-chromogranin (pg/mL)	114,50 ± 41,32	83,88 ± 88,61	0,162	0,59
U-SPINK-1 (ng/mL)	1,548 ± 1,719	1,592 ± 2,712	0,658	0,53
U-Endoglin (ng/L)	0,404 ± 0,270	0,379 ± 0,454	0,874	0,51
S-Endoglin (ng/mL)	0,840 ± 0,416	0,780 ± 0,320	0,91	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 ± 197,4	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	0,204 ± 0,0423	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,80</b>

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

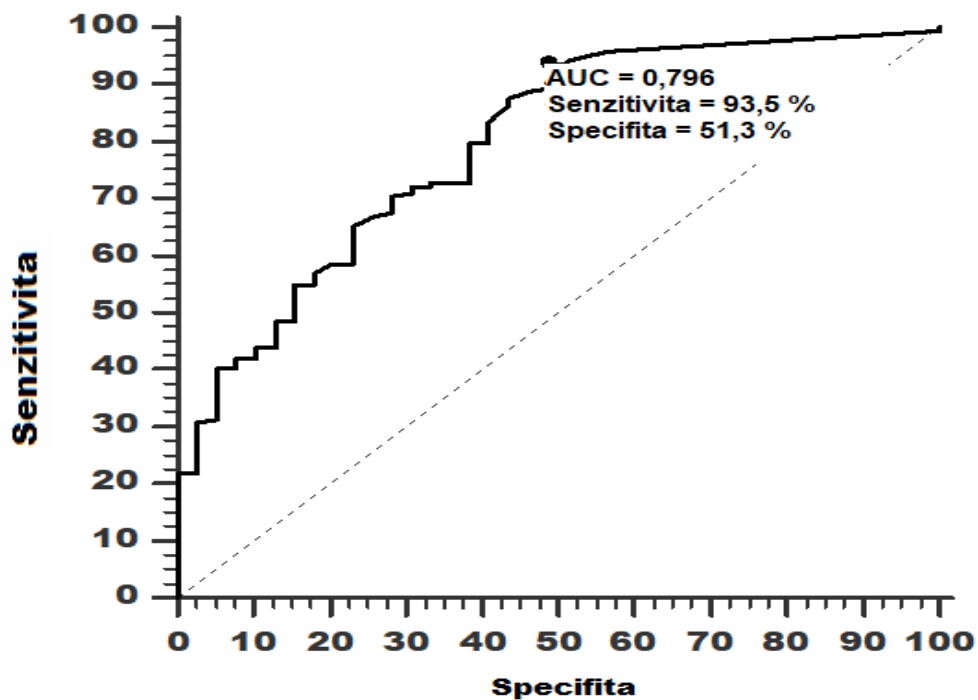
Byly nalezeny signifikantní rozdíly v sérových koncentracích thymidinkinázy u pacientů s karcinomem prostaty oproti kontrolní skupině. TK1 ukazuje vyšší diagnostickou účinnost oproti ostatním sledovaným biomarkerům. Na základě těchto výsledků byla provedena rozšířená studie na větším souboru pacientů.

#### 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 1). Diagnostická účinnost TK1 vyjádřená jako AUC vypočtená z analýzy ROC byla 0,80 (specifická = 51,3 % a senzitivita = 93,5%, obrázek 2).

**Obrázek 1: 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).

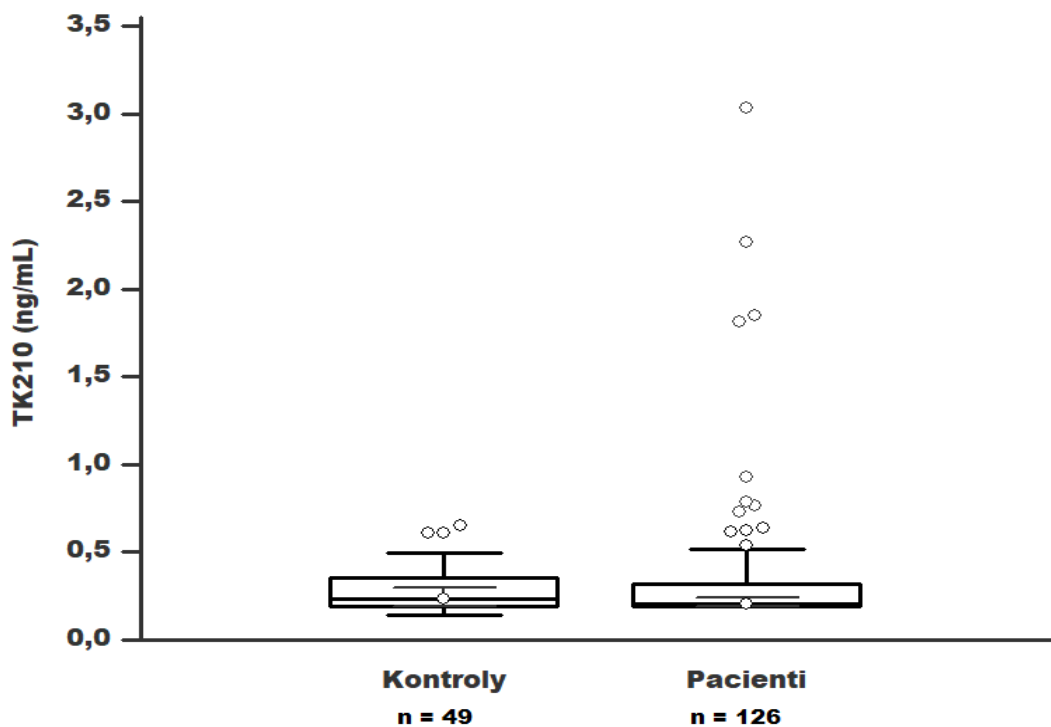
**Obrázek 2: Diagnostická účinnost TK1**

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 ( $P < 0,001$ ;  $P = 0,0030$ ).

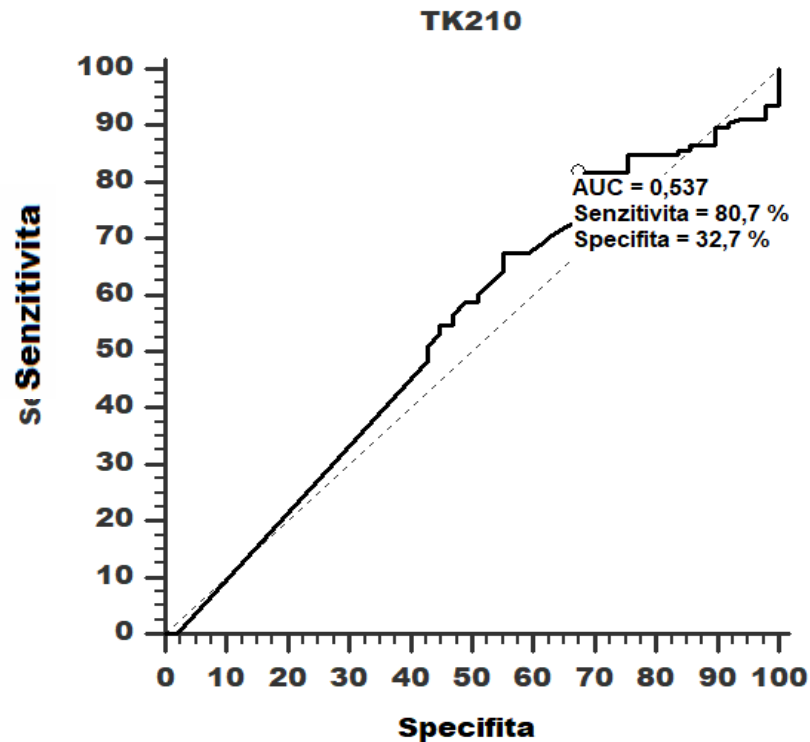
### **Stanovení epitopu TK210**

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 3). Diagnostická účinnost sérové TK210 vyjádřená jako AUC vypočtená z analýzy ROC byla 0,54 (specifická = 80,7% a senzitivita = 32,7 %, obrázek 4).

**Obrázek 3: Distribuce hodnot TK210 v souboru pacientů s karcinomem prostaty a u zdravých kontrol**



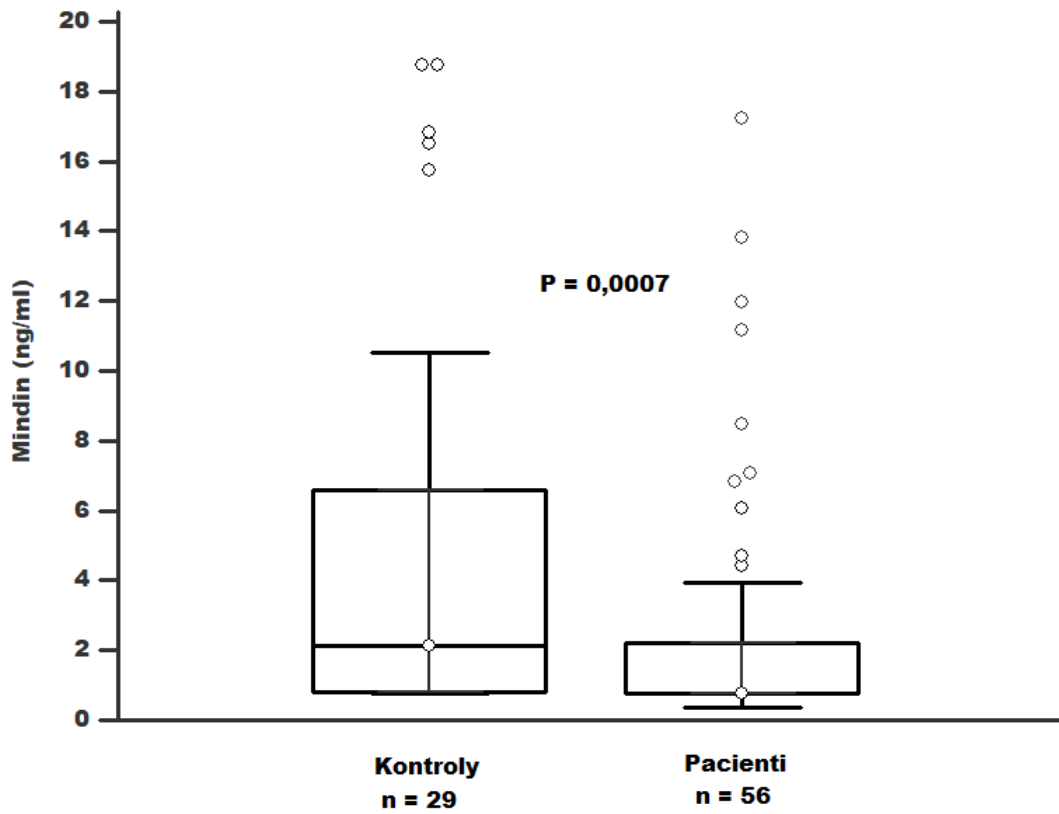
*Výsledky jsou vyjádřeny jako krabicové grafy s mediánem mezikvartilového rozpětí (25. -75 percentil)*

**Obrázek 4: Diagnostická účinnost TK210****Studie 2: Stanovení Mindinu**

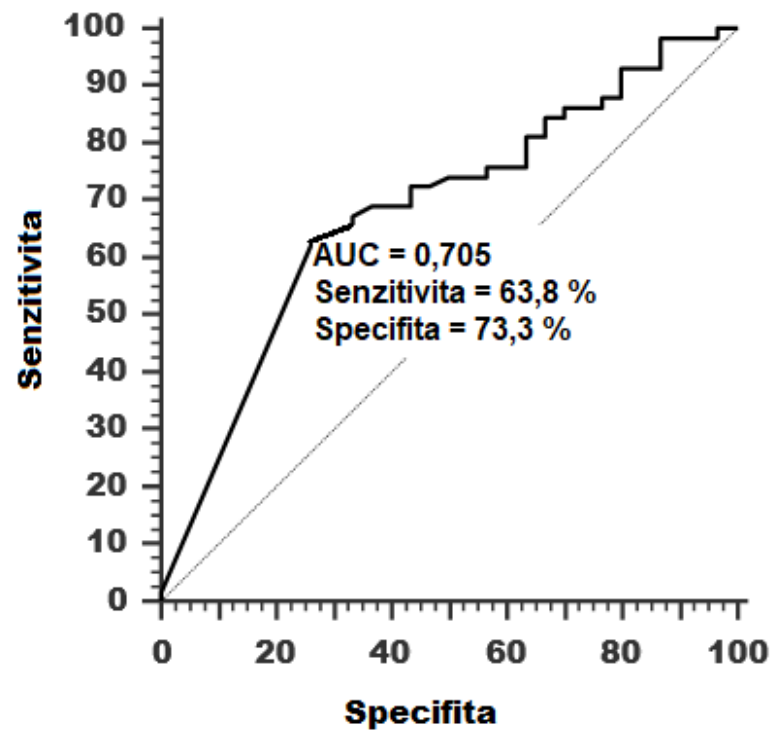
Sérové hladiny mindinu u pacientů s rakovinou prostaty byly významně sníženy oproti kontrolní skupině vyjádřené jako mediány (2,12 ng /mL vs 0,78 ng/mL,  $P = 0,0007$ , obrázek 5).

Diagnostická účinnost sérového mindinu vyjádřená jako AUC vypočtená z analýzy ROC byla 0,71 (specifita = 73 % a senzitivita = 64 %, obrázek 6). 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. ( $P = 0,012$ ,  $P = 0,02$ ).

**Obrázek 5: 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 6: 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 5.

**Tabulka 5: Koncentrace biomarkerů měřené před a pooperačně u pacientů s pHPT**

	intraoperativní		Postoperativní	P value	
	těsně 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	<b>P &lt; 0,0001</b>
<i>iFGF23 (pg/mL)</i>	56,87 (45,58 – 67,41)	57,05 (78,42 – 99,54)	<1,5	P = 0,89	<b>P &lt; 0,0001</b>
<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	<b>P = 0,0025</b>
<i>S_Ca (mmol/L)*</i>	2,71 (2,61 – 2,82)	neměřeno	2,22 (2,15 – 2,34)	----	<b>P &lt; 0,0001</b>
<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/1,73m<sup>2</sup>)</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/1,73m<sup>2</sup>)</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	<b>P &lt; 0,0001</b>	-----

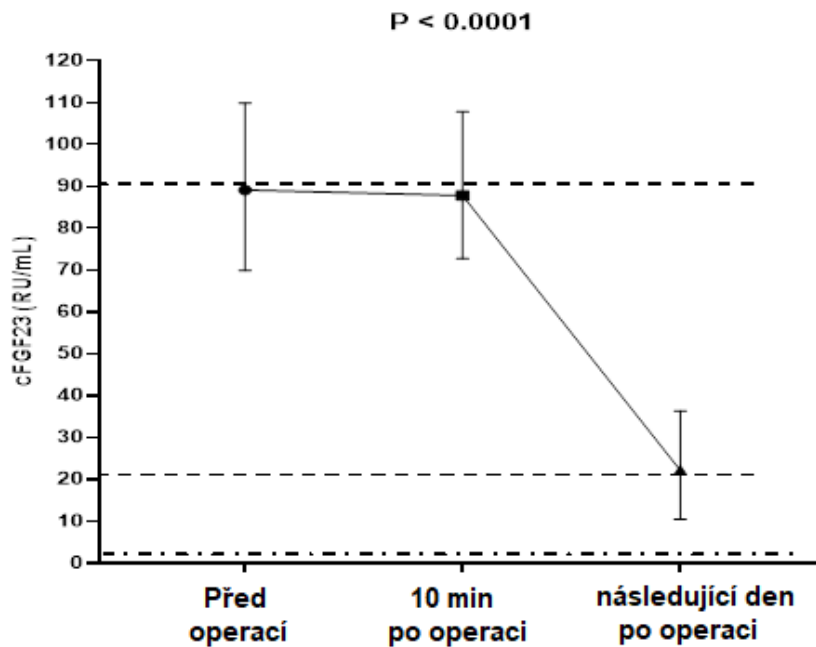
Koncentrace biomarkerů jsou vyjádřeny jako medián (95% interval spolehlivosti pro medián)

\* 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,

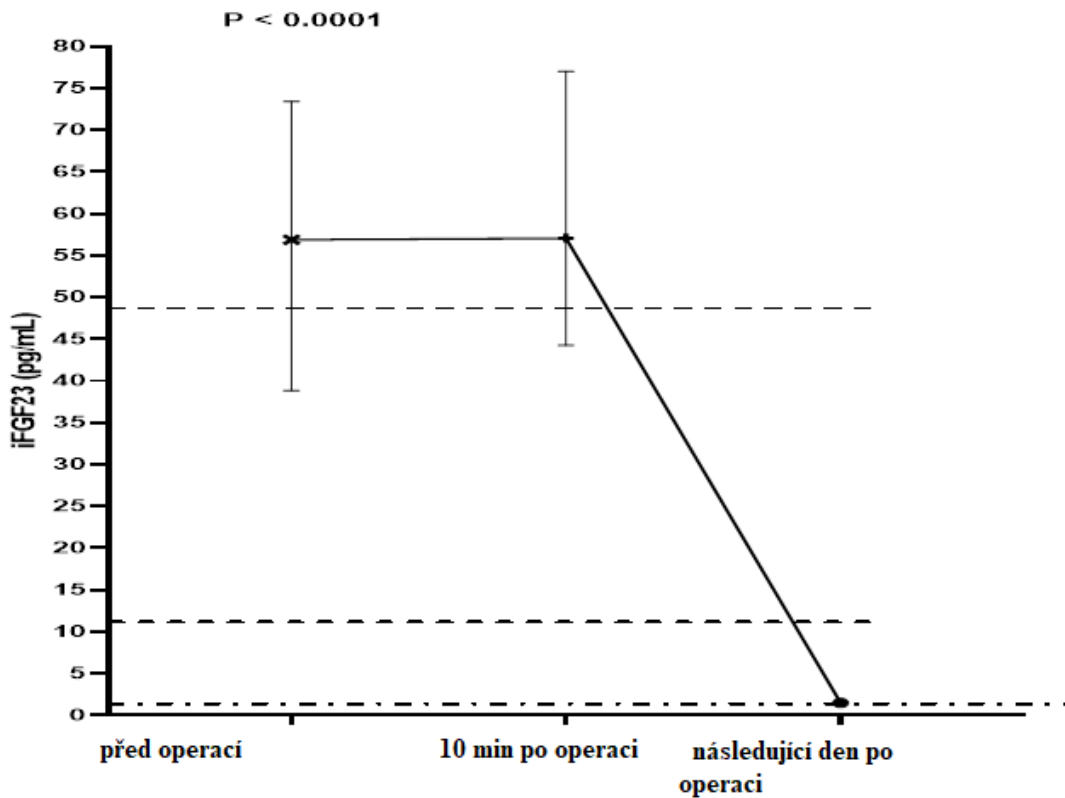
$P < 0,0001$ , obrázek 7). Podobně se snížily také hodnoty iFGF23 pooperačně, ale pooperační hodnoty byly nižší než detekční limit soupravy (obrázek 8, tabulka 5).

**Obrázek 7: 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 8: 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.

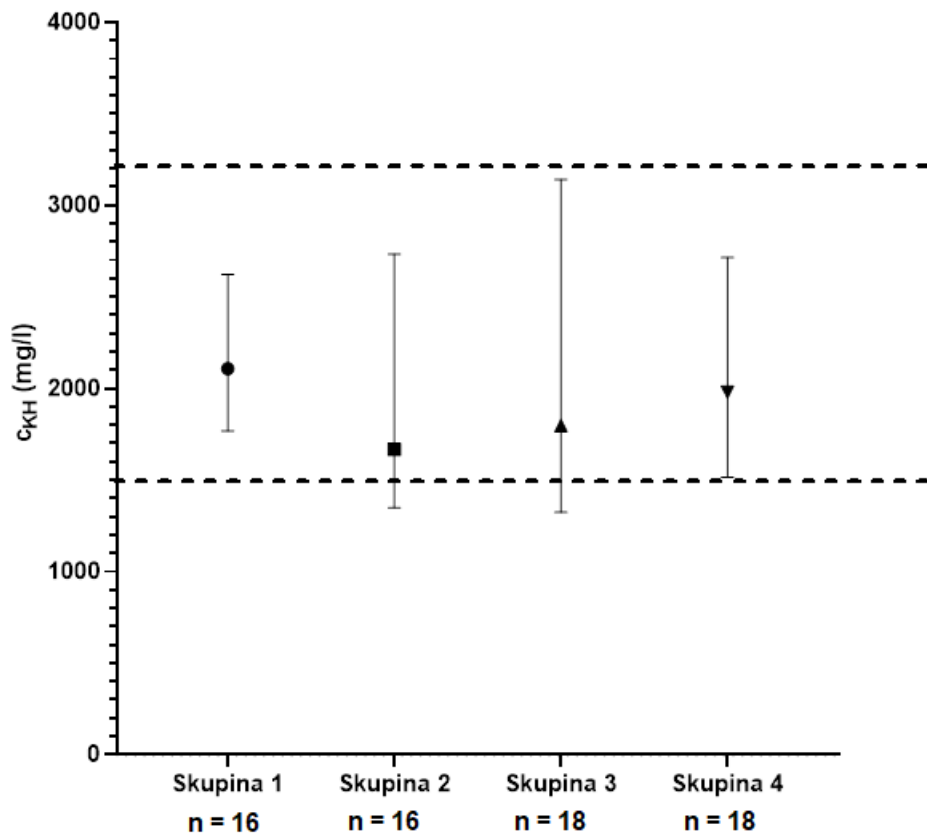
### **4.3 Posouzení možnosti využití kyseliny hyaluronové v diagnostice degenerativních onemocnění kloubů (gonartróza kolene)**

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 9. Rozdíly koncentrací HA mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné. Koncentrace HA v synoviální tekutině se nelišily od publikovaných referenčních hodnot 1500 – 3200 mg/L.

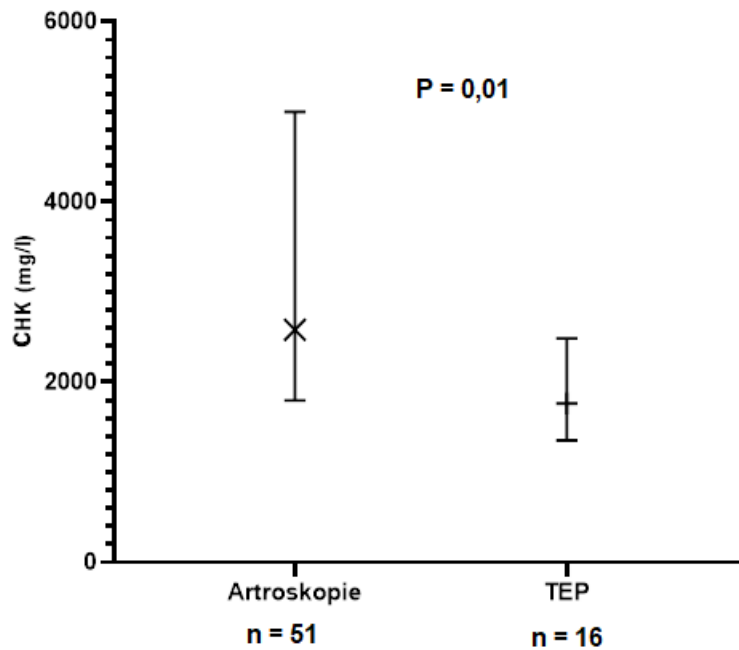
Nelze tedy jednoznačně prokázat korelaci koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině se závažností onemocnění hodnocenou dle radiologických kritérií.

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 10). 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 11).

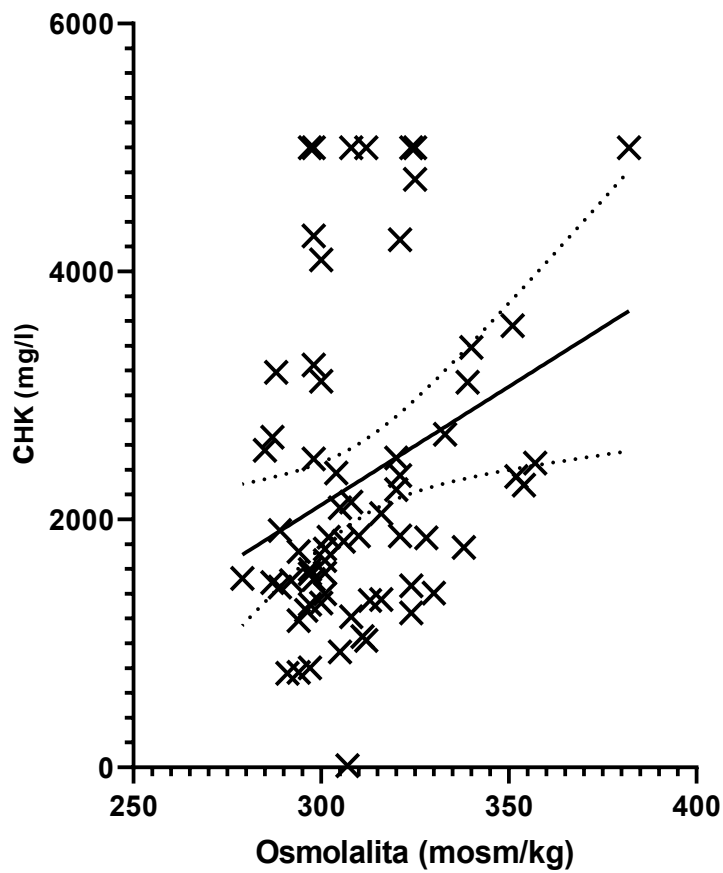
**Obrázek 9: Distribuce hodnot koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou (Skupina 1 – nejméně závažná forma onemocnění, skupina 4, nejzávažnější forma onemocnění)**



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 10: 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. -7.5 percentil) pacienti po artroskopii: Skupina po artroskopii (n = 51), skupina po TEP (n = 16)

**Obrázek 11: Vzájemná korelace koncentrací kyseliny hyaluronové a osmolality v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou**

*Tečkované čáry vymezují oblast 95% intervalu spolehlivosti regresní přímky*

## 5. 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, TIMP1 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 studii 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 korelují 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 závažnosti 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 1 a 2. 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 závažnosti 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 korelují 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 5). 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 5). 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 úrovní referenčních intervalů, jak ukazuje obrázek 7 a 8. 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  $\geq 70$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> 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 ( $1 \text{ mmol/s/1,73 m}^2$ ), 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 7). Plazmatické koncentrace iFGF23 vykázaly významnější pokles, koncentrace iFGF23 měřené 1 den po paratyreoidektomii byly dokonce nižší než deklarovaný detekční limit soupravy ( $1,5 \text{ pg/mL}$ ). 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 7 a 8 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)<sub>2</sub>D (Yamashita, *et al.*, 2014). Bilha *et al.* sledovali pacienty s hypovitaminózou vitamínu 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 vitamínu 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)<sub>2</sub>D, který je vyvolán zvýšeným PTH (Witteveen, *et al.* 2012). Hassani *et al.* Popisují zvýšenou koncentraci (1,25(OH)<sub>2</sub>D u pacientů s pHPT. Prokázali také pozitivní korelaci FGF23 s 1,25(OH)<sub>2</sub>D 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 5). 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 paratyreoidektomii 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 koreluje 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 různě 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  $r = 0,29$ ,  $P = 0,02$ , obrázek 11). Tato korelace ukazuje možnost využití kyseliny hyaluronové jako ukazatele viskozity a viskoelasticity k posouzení klinického stavu pacientů s artrózou.

## **6. 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 nekorelují se závažností onemocnění posuzovanou dle radiologických kritérií (RTG klasifikace dle Kellgrena a Lawrence).**

**Koncentrace hyaluronové kyseliny v synoviální tekutině korelují se zvýšeným osmotickým tlakem, a mohou tedy být doplňkovým ukazatelem závažnosti artrózy.**

## 7. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

### Články v časopisech s IF

Hanousková, L.<sup>1</sup>, Řezáč, J.<sup>2</sup>, Veselý, Š.<sup>2</sup>, Průša, R.<sup>1</sup>, Kotaška K.<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup>, Řezáč, J.<sup>2</sup>, Veselý, Š.<sup>2</sup>, Průša, R.<sup>1</sup>, Kotaška, K.<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup>, Hanousková L.<sup>2</sup>, Průša R.<sup>2</sup>, Trč T.<sup>1</sup>, Kotaška K.<sup>2</sup>, 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.<sup>1</sup>, Borský, J.<sup>1</sup>, Dytrych, P.<sup>1</sup>, Černý, M.<sup>3</sup>, Velemínská, J.<sup>4</sup>, Jaklová, L.<sup>4</sup>, Kotaška, K.<sup>2</sup>, Hanousková. L.<sup>2</sup>, Skřivan, J.<sup>1</sup> První příznaky sekreторické 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.<sup>1</sup>, Veselý, S.<sup>1</sup>, Hanousková, L.<sup>2</sup>, Kotaška, K.<sup>2</sup>, Babjuk, M.<sup>1</sup> Serum thymidine kinase 1 level correlates with the presence of prostate cancer, 2018 - The 18th Central European Meeting (CEM)

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

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

#### 2. Celostátní

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

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

Hanousková L. <sup>1,2</sup>, Ibllová M. <sup>1</sup>, Kotaška K. <sup>2</sup> Vyšetření volných lehkých řetězců v diagnostice mnohočetného myelomu – kazuistika, Program a sborník symposia FONS 2020, ISBN: 978-80-87436-18-9

Hanousková L. <sup>1</sup>, Kotaška J. <sup>2</sup>, Průša R. <sup>1</sup>, Trč T. <sup>2</sup>, Kotaška K. <sup>1</sup> Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině jako ukazatel závažnosti a stupně postižení u pacientů s gonartrózou Program a sborník symposia 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

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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

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.

EAU. prostate cancer guideline. uroweb. [Online] [Citace: 14. 02 2021.]  
<https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/?fbclid=IwAR0HvxN2LK4mWWGT6HShxva2qbgE-qmvYI1ih-b7VopDyMbl5WdZr74NPIU#4>.

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.

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.

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

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.

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, 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.*, 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.

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

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

KOBAYASHI, 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.

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.

LI, S, *et al.*, Serum thymidine kinase 1 is associated with Gleason score of patients with prostate carcinoma. *Oncol. Lett.* 2018, vol. 16, no. 5, p. 6171-6180.

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.

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.

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

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

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

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

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

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

SMITH, E R., *et al.*, Biological variability of plasma intact and C-terminal FGF23 measurement. *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.

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 Ther.* 2016, vol. 18, no. 18, p.1-8.

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

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

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.

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.