

UNIVERZITA KARLOVA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI  
Ústav lékařské chemie a biochemie

# Stability biomarkerů využívaných v populačních studiích

---

Stability of biomarkers used in population studies



## Disertační práce

**Vypracovala:** MUDr. Radana Vrzáková

**Školitel:** prof. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

**Studijní program:** Vnitřní nemoci

Plzeň 2024

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli prof. PharmDr. Radku Kučerovi, Ph.D. za vedení v rámci studia.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janě Dvořákové, Ph.D. a Ing. Lucii Wiesnerové, Ph.D. za připomínky, praktické rady a podporu během studia a při přípravě disertační práce. Děkuji také výtvarnici Lence Jetlebové za pomoc při vytváření ilustrací.

V neposlední řadě děkuji i své rodině za podporu, trpělivost a pomoc během mého studia a přípravě disertační práce.

MUDr. Radana Vrzáková

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně a veškeré převzaté údaje řádně citovala. V textové části jsou použity části předchozích článků, kde jsem spoluautorem, a jejichž kompletní znění je k dispozici v přílohové části práce.

Souhlasím s uložením elektronické verze své práce v databázi UK LF Plzeň.

V Plzni dne .....

.....

## Abstrakt

Slovo biomarker pochází z angličtiny a přesný překlad znamená biologická značka nebo také biologický ukazatel. National Institutes of Health definuje „biomarker“ jako vlastnost, která je objektivně měřena a hodnocena jako indikátor normálních biologických procesů, také procesů patogenních nebo indikátor farmaceutické odpovědi na terapeutickou intervenci.

Všechny biologické vzorky podléhají postupné degradaci. Je proto potřebné znát podmínky, za kterých je molekula biomarkeru stabilní, což je důležité pro potřeby správné interpretace laboratorních výsledků. Stabilita jednotlivých biomarkerů je velmi variabilní a je charakterizovaná jako doba, za kterou se počáteční obsah analytu ve vzorku nemění při zachování přesně definovaných podmínek.

V této práci jsou podrobně popsány preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření. Práce také shrnuje dosavadní obecné poznatky o stabilitě biomarkerů, je zde zmíněna důležitá role biobank a vysvětlena potřeba testování stability biomarkerů podle doporučení světové špičky v biobankingu - mezinárodní společnosti ISBER.

Praktická část práce je zaměřena na studie stability biomarkerů běžně používaných k diagnostice vzácných nádorů ovárií, k diagnostice syndromu polycystických ovárií, také k odhadu ovariální odpovědi na hormonální stimulaci během in vitro fertilizace (IVF) a k diagnostice nádorového onemocnění prostaty.

Jejím cílem je zjistit optimální preanalytické podmínky Anti-Mülleriánského hormonu (AMH) a prostatických markerů a posoudit vliv dodržování správných preanalytických podmínek na klinické a diagnostické využití těchto biomarkerů. Dalšími cíli této práce je posouzení rizik při nedodržení těchto podmínek a jejich vliv na osobu pacienta.

Dosažené výsledky prokázaly, že koncentrace AMH v různých preanalytických podmínkách zůstávají poměrně stabilní. Nejvíce stabilní byly vzorky séra skladované při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a také při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nejmenší stabilitu vykazovala skupina vzorků plazmy a séra skladované při  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Výsledky ukazují falešně nízké hladiny AMH, což může vést k nadměrnému podávání gonadotropinů ke stimulaci vaječnicků při IVF. Rizikem je pak rozvinutí ovariálního hyperstimulačního syndromu a jeho závažných komplikací.

V práci byla prokázána velká stabilita tPSA za různých zátěžových podmínek, naopak stabilita fPSA i [-2]proPSA se ukázala jako nízká. Koncentrace fPSA v čase během zátěžových podmínek klesala, koncentrace [-2]proPSA se naopak zvyšovala. Protože se při výpočtu PHI používá [-2]proPSA, každé zvýšení ovlivní konečnou hodnotu tohoto indexu. Výsledkem nedodržení správných preanalytických podmínek je falešně diagnostikovaný PCa a s tím spojená nejen vysoká diagnostická, ale i psychická zátěž pacienta.

Na základě získaných výsledků je možno vydat konkrétní doporučení pro laboratoře.

**Klíčová slova:** biomarker, stabilita, preanalytické podmínky, sérum, plazma, AMH, PSA, fPSA, [-2]proPSA, PHI, karcinom prostaty, imunochemická analýza

## Abstract

The word biomarker comes from English and the exact translation means biological marker or biological indicator. The National Institutes of Health defines a “biomarker” as a property that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, including pathogenic processes, or an indicator of a pharmaceutical response to a therapeutic intervention.

All biological samples undergo gradual degradation. It is therefore necessary to know the conditions under which the biomarker molecule is stable, which is important for the needs of correct interpretation of laboratory results. The stability of individual biomarkers is highly variable and it is characterized as the time during which the initial content of the analyte in the sample does not change while maintaining precisely defined conditions.

In this thesis, the pre-analytical influences on the result of the laboratory examination are described in detail, the thesis also summarizes the current general knowledge about the stability of biomarkers, the important role of biobanks is mentioned here and the need for testing the stability of biomarkers according to the recommendations of the world leader in biobanking - the international company ISBER is explained.

The practical part of the thesis is focused on studies of the stability of biomarkers commonly used to diagnose rare ovarian tumors, to diagnose polycystic ovary syndrome, as well as to estimate the ovarian response to hormonal stimulation during in vitro fertilization (IVF) and to diagnose prostate cancer.

The aim of the practical part is to determine the optimal pre-analytical conditions for Anti-Müllerian hormone (AMH) and prostatic markers and to assess the effect of observing the correct pre-analytical conditions on the clinical and diagnostic use of these biomarkers.

The achieved results demonstrated that AMH concentrations remain relatively stable in various pre-analytical conditions. The worst results are shown by the group of plasma and serum samples stored at 22 °C, as well as plasma samples during repeated thawing and also during storage at 4 °C. The results show falsely low AMH levels, which can lead to over-diagnosis of gonadotropins for ovarian stimulation in IVF. The risk is the development of ovarian hyperstimulation syndrome and its serious complications.

The achieved results further demonstrated the great stability of tPSA under various stress conditions, on the other hand, the stability of fPSA and [-2]proPSA proved to be low. The concentration of fPSA decreased over time during exercise conditions, while the concentration of [-2]proPSA, on the contrary, increased. Since [-2]proPSA is used in the calculation of PHI, any increase will affect the final value of this index. Failure to comply with the correct pre-analytical conditions results in falsely diagnosed PCa and the associated high diagnostic stress of the patient.

Based on the results achieved, it is possible to issue specific recommendations for laboratories.

**Key words:** biomarker, stability, preanalytical conditions, serum, plasma, AMH, PSA, fPSA, [-2]proPSA, PHI, prostate cancer, immunochemical analysis

## Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Teoretická část	10
1.1 Úvod	10
1.2 Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření	11
1.3 Biomarkery	14
1.4 Stabilita biomarkerů	16
1.5 Biobanky	18
1.6 Klinická versus statistická významnost	19
1.7 Anti-Mülleriánský hormon (AMH)	20
1.7.1 Objev AMH	20
1.7.2 Struktura AMH	20
1.7.3 Fyziologie AMH	22
1.7.4 Role AMH při diferenciaci pohlaví	23
1.7.5 Postnatální funkce AMH	25
1.7.6 AMH – klinické využití	26
1.7.7 AMH – stanovení	29
1.8 PSA	30
1.8.1 Formy PSA přítomné v krvi	31
1.8.2 Klinický význam stanovení prostatických markerů	32
1.8.3 Benigní hyperplazie prostaty	35
1.8.4 Karcinom prostaty	36
2 Praktická část	42
2.1 Cíle práce:	42
2.2 Materiál a metodika	43
2.2.1 AMH design studie	43
2.2.2 Skupina pacientů pro stanovení AMH	43
2.2.3 Odběry vzorků pro stanovení AMH	43
2.2.4 Zpracování vzorků	44
2.2.5 PSA design studie	46
2.2.6 Skupina pacientů pro stanovení PSA markerů	46
2.2.7 Odběry vzorků pro stanovení PSA markerů	47
2.2.8 Zpracování vzorků	47
2.2.9 Analýza vzorků	49
2.2.10 Princip použité imunoanalytické metody	51
2.2.11 Statistická analýza získaných dat	52
3 Souhrn výsledků a jejich diskuze	54
3.1 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 1	54
3.2 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 2	66
3.3 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 3	68
3.4 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 4	79

4	Závěry .....	89
4.1	Závěry vztahující se k cíli 1 .....	89
4.2	Závěry vztahující se k cíli 2 .....	90
4.3	Závěry vztahující se k cíli 3 .....	91
4.4	Závěry vztahující se k cíli 4 .....	92
4.5	Závěry pro praxi a výhled do budoucna .....	93
5	Seznam použité literatury .....	94
6	Seznam tabulek .....	112
7	Seznam obrázků .....	113
8	Seznam příloh .....	115

## Seznam použitých zkratek

ACP:	kyselá fosfatáza
ACTH:	adrenokortikotropní hormon
ALP:	alkalická fosfatáza
ALT:	alaninaminotransferáza
AST:	aspartátaminotransferáza
AMH:	Anti-Mülleriánský hormon
Cd:	kadmium
CLIA:	chemiluminiscenční imunoanalýza
BBMRI-ERIC:	BioMolecular Resources Research Infrastructure–European Research Infrastructure Consortium
BHP:	benigní hyperplazie prostaty
BMI:	body mass index
BRCA1, 2:	tumor supresorové geny rakoviny prsu 1, 2
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ER:	endoplazmatické retikulum
FSH:	folikulostimulační hormon
GCT:	granulózní buněčný tumor
GLP:	good laboratory practice
GnRH:	gonadoliberin
GS:	Gleasonovo skóre
HC:	hormonální antikoncepce
HDI:	index lidského rozvoje
HPG:	hypotalamus-hypofýza-gonády
Ig:	imunoglobulin
ISBER:	International Society for Biological and Environmental Repositories
ISUP:	Mezinárodní společnost pro urologickou patologii
IVF:	in vitro fertilizace
LH:	lithium heparin



LUTS:	syndrom dolních cest močových
mpMRI:	multiparametrická magnetická rezonance
OHSS:	ovariální hyperstimulační syndrom
OID:	Oddělení imunochemické diagnostiky
PCa:	karcinom prostaty
PCOS:	syndrom polycystických ovarii
PET:	pozitronová emisní tomografie
PHI:	index zdraví prostaty
PSA:	prostatický specifický antigen
RT:	room temperature
SNP:	jednonukleotidový polymorfismus
SOP:	standardní operační postup
SS:	signální sekvence
TGF- $\beta$ :	transformační růstový faktor $\beta$
TRUS:	transrektální ultrasonografie
VEGF:	vaskulární endoteliální růstový faktor

# 1 Teoretická část

## 1.1 Úvod

Tato práce je zaměřena na studie stability biomarkerů běžně používaných k diagnostice vzácných nádorů ovárií, k diagnostice syndromu polycystických ovárií, k odhadu ovariální odpovědi na hormonální stimulaci během in vitro fertilizace (IVF) a k diagnostice nádorového onemocnění prostaty.

Práce si klade za cíl zjistit optimální preanalytické podmínky Anti-Mülleriánského hormonu (AMH) a prostatických markerů a posoudit vliv dodržování správných preanalytických podmínek na klinické a diagnostické využití těchto biomarkerů.

Dalšími cíli je posoudit rizika při nedodržení těchto podmínek a jejich vliv na osobu pacienta.

Práce je rozčleněna na dvě hlavní části – na část teoretickou a část praktickou.

Teoretická část je věnována přehledu současných poznatků o problematice stability biomarkerů. Podrobně jsou popsány preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření s důrazem na stabilitu biomarkerů. Další kapitoly se zabývají charakteristikami a klinickým významem vybraných biomarkerů.

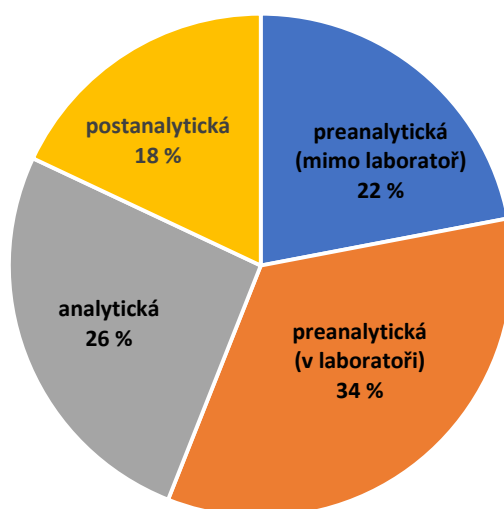
V souladu s cíli práce je členění metodiky, výsledků a závěrů, které jsou zařazeny do praktické části disertační práce. V metodice je popsána vždy v každé kapitole zvlášť charakteristika studie, skupina dobrovolníků či pacientů a použité metody. První výsledková část je věnována zhodnocení vzorků od zdravých mladých dobrovolníků, s důrazem na indikace ke stanovení AMH převážně u žen. Ve druhé části je posouzen vliv nedodržení vhodných preanalytických podmínek na klinické využití tohoto biomarkeru a rizik, která z toho plynou pro pacientky. Ve třetí části je zpracován soubor mužských pacientů středního věku sledovaných pro podezření na karcinom prostaty. Ve čtvrté části práce jsou počítány a vyhodnocovány indexy přispívající ke zpřesnění diagnostiky karcinomu prostaty a také je posouzen vliv těchto počítaných parametrů na diagnostiku onemocnění. Jsou zde zhodnocena rizika plynoucí z nedodržení správných preanalytických podmínek pro pacienta. Závěr práce je věnován hodnocení dosažených výsledků výzkumu s důrazem na jejich využití v klinické praxi.

Přínosem této práce je přesnější a podrobnější poznání vlastností uvedených biomarkerů a zahrnutí těchto poznatků do doporučení při odběru a dalším zpracování vzorků.

## 1.2 Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření

Laboratorní vyšetření je velmi důležitou součástí při stanovování diagnózy pacienta. Také má svoji důležitou úlohu při monitorování průběhu nemoci pacienta, při určování prognózy nemoci a v neposlední řadě má svoji úlohu při prevenci a screeningu [Zima, 2010].

Průběh laboratorního vyšetření má tři fáze: **preanalytickou**, také někdy označovanou jako přípravnou, **analytickou**, zahrnující vlastní analýzu vzorku a procesy s tím spojené, a **postanalytickou**, při které se jedná hlavně o zpracování výsledkového protokolu a jeho předání na příslušná pracoviště včetně interpretace výsledků s případnou konzultací (obrázek 1) [Racek et al., 2021].



**Obrázek 1 - Jednotlivé fáze laboratorního vyšetření**

[Upraveno podle Racek et al., 2021]

Preanalytická fáze laboratorního vyšetření se dělí na část odehrávající se mimo laboratoř a na část prováděnou v laboratoři. Fáze laboratorního vyšetření provedená mimo laboratoř zahrnuje především tyto procesy: přípravu pacienta před odběrem, odběr biologického materiálu, jeho uchování a transport z odběrového místa do laboratoře. Tato část je závislá na kvalitní spolupráci laboratoře s odborným personálem z oddělení nebo ambulancí požadujících dané stanovení. Preanalytická fáze laboratorního vyšetření provedená v laboratoři zahrnuje: registraci přijatého vzorku, přípravu vzorku na vlastní analýzu a jeho skladování do provedení analýzy [Racek et al., 2021].

Aby bylo dosaženo perfektního výsledku s informací využitelnou ve prospěch pacienta, je potřeba, aby všechny fáze laboratorního vyšetření byly provedeny kvalitně, bez chyb. K ovlivnění výsledku laboratorního vyšetření může dojít během všech fází. Za správnost a spolehlivost analytické fáze zodpovídá laboratoř, která se řídí dodržováním GLP – good laboratory practice – zásadami správné laboratorní praxe. Také v postanalytické fázi laboratorního vyšetření může být výsledek ovlivněn, nejčastěji chybou v tisku a v přenosu

dat. Nejvíce chyb při laboratorním vyšetření (podle autorů jde až o 60 % chyb) však vzniká během fáze preanalytické [Zima, 2013]. Jedná se také o fázi v průměru nejdelší, kde se může projevit vliv mnoha faktorů [Racek et al., 2021; Zima, 2013]:

- ***osoba pacienta***

Zde se jedná zejména o poučení pacienta, jak se na odběr vzorku správně připravit. Za tuto část odpovídá klinické pracoviště, které se řídí doporučeními vydanými laboratorní [FN Plzeň, 2023; FN Motol, 2020]. Při vlastním odběru vzorku je potřeba posoudit informace o pacientovi. Je třeba vzít v potaz věk a pohlaví pacienta, taktéž jeho rasu, současně probíhající jiné onemocnění pacienta, graviditu pacientky, ale také diurnální rytmus vyšetřovaného biomarkeru (např. kortizol), biologický poločas stanovované látky a způsob stanovení referenčních hodnot. Výše zmíněné jsou faktory, které nelze ovlivnit. Faktory, které ovlivnit lze, jsou především: fyzická aktivita a psychický stav pacienta, užití tekutin před odběrem vzorku, druh potravy, kouření, užívané léky, abúzus alkoholu a drog [Racek et al., 2021; Narayan, 2000].

- ***odběr vzorku***

V této fázi ovlivňuje výsledek laboratorního vyšetření hlavně způsob odběru vzorku v závislosti na druhu odebíraného biologického materiálu (arteriální, venózní, kapilární krev), dále vhodná odběrová nádobka a způsob provedení odběru vzorku (např. pro stanovení aldosteronu nesrážlivá krev, pacient při odběru vleže). Odběr vzorku může být ovlivněn denní dobou odběru. Většina odběrů se provádí ráno na lačno, kromě analytů s výrazným diurnálním rytmem, které je potřeba nabírat v přesných časech (např. ranní kortizol versus odpolední kortizol). Při odběru vzorku je potřeba také přesná a jednoznačná identifikace pacienta a biologického materiálu [Zima, 2010].

- ***transport vzorku***

Mnoho vzorků je přepravováno z menších laboratoří nebo sběrných míst do laboratoře centrální, což vyžaduje přísné dodržování protokolů pro odběr vzorků a další manipulaci s nimi [Hedayati et al., 2020]. Transport vzorku do laboratoře musí být především dostatečně rychlý, vzorek musí být chráněn před extrémními teplotami a mechanickými vlivy, některé typy vzorků dokonce vyžadují uchovávání za správných světelných podmínek (z důvodu např. degradace bilirubinu nebo kyseliny listové na světle). Vždy musí být brán v potaz typ biochemického vyšetření a tomu přizpůsobené podmínky a teplota transportu, a také doporučení laboratoře (např. pro stanovení adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a metanefrinů je nutno provést odběr krve do předem vychlazené umělohmotné zkumavky s protisrážlivou úpravou a transportovat v ledové tříšti do laboratoře do jedné hodiny po odběru nebo transportovat přímo zmrazenou plazmu na  $-70^{\circ}\text{C}$  na suchém ledě; na rozdíl od stanovení aldosteronu, kdy je nutný transport při pokojové teplotě) [FN Plzeň, 2022].

- ***uchování vzorku před vlastní analýzou***

Není-li analýza vzorku provedena ihned po odběru, je nutné vzorek uchovat v chladničce v dobře uzavřené zkumavce, aby nedošlo ke zkoncentrování analytů vlivem odpaření vody. U některých analytů je však doporučováno uchování při laboratorní teplotě (např. únik draslíku z buněk vlivem klesající funkce enzymu Na/K ATPázy vlivem poklesu teploty) [Racek et al., 2021]. Při delším skladování je

nutno vzorky uchovat zmrazené při -20 °C nebo -80 °C. Vzorky lze upravit i lyofilizací. Doba skladování vždy závisí na stabilitě daného biomarkeru a je nutné držet se doporučení vydaných příslušnou laboratoří [Betsou et al., 2013].

- ***příprava vzorku ke zpracování***

Plazma a sérum by měly být odděleny centrifugací od buněk ideálně co nejrychleji, aby se zabránilo buněčnému metabolismu a pohybu analytů mezi buňkami a plazmou nebo sérem. Prodloužený kontakt plazmy nebo séra s krvinkami, ke kterému dochází v důsledku pozdější centrifugace, je častou příčinou falešných výsledků laboratorního stanovení [Boyanton and Blick, 2002]. Je důležité zachovat při centrifugaci a separaci séra či plazmy od krevních elementů správné a vhodné podmínky. Pro oddělení krevních elementů od séra/plazmy se nejčastěji centrifuguje při 1 000–1 500 g (g = násobek gravitačního zrychlení) po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Delší doba centrifugace nebo zvýšení počtu g často způsobují částečnou či úplnou hemolýzu. Plazma nebo sérum mají být odděleny co možná nejdříve, nejpozději však do 2 hodin od odběru [Zima, 2013]. Je také možné transportovat vzorky až po centrifugaci, což znamená transport séra nebo plazmy [Zaninotto et al., 2012].

- ***hemolýza***

Řadu vyšetření (např. draslík, AST, ALT, thymidinkináza) zkresluje hemolýza vzorku, která může vznikat při nesprávném odběru krve (příliš úzká jehla, dlouhé zaškrcení turniketem), nešetrným protřepáním odběrové zkumavky, vysokou nebo nízkou teplotou. Dalším faktorem ovlivňujícím laboratorní stanovení je také nepřilíš častá trombolýza, při které dochází ke zvýšení koncentrace draslíku v séru [Zima, 2010].

Podle řady autorů nerespektování výše uvedených preanalytických vlivů způsobuje chybný výsledek nebo jeho nesprávnou interpretaci častěji než chyba v analytické fázi [Racek et al., 2021; Zima, 2010].

### 1.3 Biomarkery

Slovo biomarker pochází z angličtiny a přesný překlad znamená biologická značka nebo také biologický ukazatel. National Institutes of Health definuje „biomarker“ jako vlastnost, která je objektivně měřena a hodnocena jako indikátor normálních biologických procesů, procesů patogenních, a také jako indikátor farmaceutické odpovědi na terapeutickou intervenci [Romero Otero et al., 2014; Ilyin et al., 2004].

Nádorové biomarkery tzv. onkomarkery jsou biochemické látky přítomné v organismu jako důsledek maligního procesu. Jsou produkovány buď samotným nádorem, nebo nenádorovými buňkami v reakci na přítomnost nádoru. Onkomarkery mohou pronikat z nádorových tkání do tělesných tekutin, kde se může jejich koncentrace měřit. V tomto případě se hovoří o humorálních onkomarkerech. Ve vyšetřovaných tekutinách mají u zdravého člověka nulovou nebo nižší hodnotu než u pacienta s nádorem. Ke stanovení jejich koncentrace se nejčastěji využívají metody imunochemické. Při monitoraci onemocnění je důležité stanovovat nádorové markery jednou metodikou v jedné laboratoři. Strukturně se jedná většinou o glykoproteiny a polypeptidy. Z hlediska biologické funkce jsou to markery buněčné adheze (např. karcinomový antigen 125 – CA 125), hormony (např. lidský choriový gonadotropin – hCG), enzymy (např. prostatický specifický antigen – PSA), stavební složky cytoskeletu (např. tkáňový polypeptidový specifický antigen – TPSA), transportní a imunokompetentní látky (např. alfa-fetoprotein – AFP) [Kaušitz et al., 2003]. Existují i další skupiny onkomarkerů, jako buněčné onkomarkery (např. estrogenové receptory u karcinomu prsu, stanovované imunohistochemicky), cirkulující nádorové buňky (např. prokazatelné v moči u karcinomu močového měchýře) a genetické abnormality (detekce mutací v onkogenech a tumor supresorových genech např. BRCA1 a BRCA2) [Racek et al., 2021].

Ideální onkomarker by měl být produkován pouze u maligních onemocnění, být orgánově specifický, vyskytovat se ve vyšetřovaných tekutinách ve vysokých koncentracích a korelovat s velikostí a rozsahem nádoru, se stadiem onemocnění, s prognózou a účinností terapie [Racek et al., 2021]. V současné době není známý žádný takový onkomarker, který by splňoval najednou všechny výše zmíněné požadavky. Stanovení onkomarkerů má tak své limity, ale při dobré znalosti indikace vyšetření jednotlivých nádorových markerů jsou výborným pomocníkem onkologa při péči o onkologické pacienty [Karlíková, 2018].

Stanovení nádorových markerů se využívá k zpřesnění diagnózy, sledování průběhu choroby a efektu terapie, k časnému záchytu relapsu onemocnění a určení prognózy. Onkomarkery se jako celoplošné screeningové vyšetření nehodí pro nízkou citlivost a nedostatečnou specificitu, mohou být ale využívány pro vyšetření rizikových skupin (např. PSA se využívá ke screeningu u rizikových pacientů pro karcinom prostaty). Onkomarkery se také z výše uvedených příčin nehodí k primární diagnostice nádorů. Je třeba si uvědomit, že až na výjimky (např. orgánově specifický PSA) nejsou nádorové markery ani nádorově, ani orgánově specifické a mohou být zvýšeny i z nenádorových příčin. Je proto důležité znát optimální indikace, proč se onkomarker stanovuje a co je od výsledku očekáváno, také jaké jsou limity těchto vyšetření a jaká je vhodná frekvence opakování těchto vyšetření. Jednorázové vyšetření onkomarkerů má jen velmi omezený význam. Základem využití těchto markerů v praxi je dynamické sledování jejich hladiny ve vyšetřované tekutině. Vždy je nutné stanovit hladinu daného onkomarkeru před léčbou (chirurgickou, chemoterapeutickou nebo radiologickou). Lékaři by měli také znát biologický poločas

stanovovaného onkomarkeru a správně tak načasovat kontrolní odběr. Sledováním příslušných onkomarkerů je možno do jisté míry individualizovat dispenzární péči o pacienty. Co se týká včasného zachytu relapsu onemocnění, uvádí se, že nádorové markery mohou upozornit na recidivu onemocnění až o několik měsíců dříve než zobrazovací techniky. Je však velmi vhodné obě tyto metody kombinovat [Karlíková, 2018].

Pro klinické využití nádorových markerů a frekvence kontrol jejich hladin po primární terapii jsou vydávána doporučení expertních skupin [Karlíková, 2018].

## 1.4 Stabilita biomarkerů

Všechny biologické vzorky podléhají postupné degradaci. Je proto potřebné znát jednak biologický poločas biomarkeru (doba, za kterou se množství určité látky v organismu sníží na polovinu) a také podmínky, za kterých je molekula biomarkeru stabilní, což je důležité pro potřeby správné interpretace laboratorních výsledků. Stabilita jednotlivých biomarkerů je velmi variabilní a je charakterizovaná jako doba, za kterou se počáteční obsah analytu ve vzorku nemění při zachování přesně definovaných podmínek [Nezbeda, 2018].

Neoddiskutovatelný vliv na stabilitu biomarkerů má jak doba a způsob transportu vzorku do laboratoře, tak hlavně doba a způsob skladování vzorků až do vlastní analýzy biomarkeru. Minimalizovat interval mezi odběrem vzorku a jeho zpracováním je nejlepší strategií, jak zabránit změnám v aktivitách a koncentracích analytů. Některá doporučení jsou však v běžné praxi obtížně aplikovatelná. Velmi záleží také na biologickém materiálu, ve kterém se daný analyt nachází (krev, sérum, plazma). Pokud je u některých biomarkerů jejich stabilita ovlivněna kontaktem s krevními elementy, je vhodné použít zkumavky se separačními gely. Gel použitý v těchto zkumavkách je relativně inertní, může však ovlivnit koncentrace nebo stabilitu analytu [Hedayati et al., 2020]. Naopak pro stanovení některých hormonů je použití odběrové zkumavky se separačním gelem nevhodné. Podle studií zpracovaných Hedayati et al. je známo, že EDTA chrání peptidy před proteolýzou, proto bývá vhodnější odebrat vzorky do zkumavek s EDTA [Hedayati et al., 2020]. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2, je u některých méně stabilních látek potřeba odebírat krev do předem vychlazené zkumavky nebo transportovat v ledové tříšti (např. nesrážlivá krev pro stanovení parathormonu, ACTH) [Vaše laboratoře, 2019]. Ne všechny analyty jsou stanovovány ihned po odběru vzorků. Některé analyty se stanovují jednou týdně (např. progesteron), některé jednou za dva týdny (např. aldosteron) až měsíc (např. osteáza – kostní alkalická fosfatáza [FN Plzeň, 2022]). V případě dlouhodobějších studií se mohou některé analyty stanovovat v rozmezí několika měsíců až let [Simanek et al., 2018].

V klinických laboratořích, zejména v nemocničních laboratořích, se vzorky séra a plazmy často uchovávají po určitou dobu pro případnou pozdější reanalýzu. Znalosti stability analytů ve vzorcích skladovaných při teplotě místnosti nebo nižších teplotách pro opakovanou analýzu jsou proto velmi důležité. Podle studie Dupuy et al. byly LDH a bikarbonát prokázány jako analyty s nejnižší stabilitou po centrifugaci, proto nemůže být povolena jakákoli reanalýza těchto látek v již zcentrifugovaných zkumavkách. Centrifugace před transportem je časově náročná a přenos plazmy nebo séra z primární zkumavky do sekundární zkumavky zvyšuje riziko preanalytických chyb. U analytů, které jsou stabilní v plné krvi po dobu 24 hodin nebo déle, se zdá, že není přínosné centrifugovat před transportem [Dupuy et al., 2018].

V dostupné odborné literatuře lze najít určité množství experimentálních studií hodnotících stabilitu většiny laboratorních analytů v různých podmínkách, ale existuje jen málo klinických pokynů s přesnými doporučeními pro laboratoře. Většinou se jedná o obecná doporučení vydaná na podkladě různých, neúplných nebo částečných studií, jejichž výsledky nejsou konzistentní z důvodu odlišných metodik stanovení a odlišného protokolu testování stability kvůli nedostatku standardních experimentálních návrhů. Také z vlastní praxe je ověřeno, že tyto informace často nejsou dostačující. Pro správnou klinickou interpretaci laboratorních výsledků a také pro využití zamražených vzorků v dalším medicínském výzkumu je nutné mít hlubší a přesnější znalosti o preanalytických podmínkách a stabilitách



biomarkerů. Při nedodržení správných preanalytických podmínek vzniká riziko špatné interpretace výsledku s rizikem zbytečné další zátěže pacienta. V případě dlouhodobějších prospektivních i retrospektivních studií může dojít i ke zkreslení výsledků těchto studií [Vrzáková et al., 2023].

## 1.5 Biobanky

Biobanky sbírají, shromažďují, skladují a poskytují vzorky biologického materiálu a s nimi související data a informace [Kinkorová and Topolčan, 2016]. Světovým lídrem mezi společnostmi zabývající se biobankingem je mezinárodní společnost **I**nternational **S**ociety for **B**iological and **E**nvironmental **R**epositories (ISBER). Náplní této nadnárodní společnosti je provozování biobank a repozitářů jak humánních, tak také zvířecích, rostlinných a mikroorganismů. Mezi další činnosti patří vytváření pokynů a protokolů pro preanalytické a skladovací podmínky biologických vzorků (např. ISBER Best Practices, 2018) [Campbell et al., 2018]. Instituce při jejich tvorbě čerpala z vlastních bohatých zkušeností [Betsou et al., 2013]. ISBER také podporuje inovace ve vědě, vzdělávání a školení v biobankingu, dále poskytuje informace o repozitářích, koordinuje spolupráce a kooperace s ostatními společnostmi provozujícími biobanky a také publikuje [Kinkorová, 2019].

V současné době je většina biobank lokálních a jsou jen velmi málo využitelné pro mezinárodní spolupráci kvůli omezenému přístupu k biologickým vzorkům, medicínským datům a dalším informacím. Proto byla založena evropská infrastruktura biobank – Biobanks and BioMolecular Resources Research Infrastructure – European Research Infrastructure Consortium (BBMRI-ERIC). Tato panevropská infrastruktura si klade za cíl zlepšení dostupnosti a kooperace mezi akademickými a průmyslovými partnery. Toto by bylo velkým přínosem pro personalizovanou medicínu, prevenci nemocí, podporu vývoje nových diagnostických nástrojů a léčiv [Kinkorová and Topolčan, 2016; van Ommen et al., 2015; Malm et al., 2013].

Česká republika je jedním ze zakládajících členů BBMRI-ERIC. LF UK a FN v Plzni je jedním z pěti pracovišť v České republice, které jsou členy této evropské infrastruktury. Dalšími členy jsou Masarykův onkologický ústav v Brně, 1. LF UK a VFN v Praze, LF UK a FN HK v Hradci Králové a Ústav molekulární a translační medicíny Univerzity Palackého v Olomouci. Na rozdíl od ISBER pracují české biobanky s výhradně humánním biologickým materiálem. Rozdělují se na biobanky populační (obsahují materiál od dobrovolných dárců bez specifických požadavků), orientované na nemoci (např. onkologické biobanky), tkáňové biobanky a virtuální biobanky, které mají na starosti katalogy, databáze a seznamy biobank [Kinkorová, 2019].

## 1.6 Klinická versus statistická významnost

Vědci musí ve svých studiích často řešit otázky: Je tento výsledek statisticky významný? Pokud ano, je významný také klinicky?

Statistická významnost znamená, že rozdíl pozorovaný v souboru vzorků není náhodný, ukazuje tak na spolehlivost výsledků studie. Jsou různé způsoby vyjádření statistické významnosti (hodnota  $p$ , interval spolehlivosti) [Ranganathan et al., 2015].

Klinická významnost odráží dopad na klinickou praxi. Znamená, že tento rozdíl je důležitý i klinicky a je možné, že ovlivní rozhodování lékaře v klinické praxi, pokud se takový rozdíl objeví [Ranganathan et al., 2015].

Termíny klinická významnost a statistická významnost jsou však často zaměňovány a jeden nemusí nutně znamenat druhý. Výzkumníci někdy usuzují, že např. účinnost léčby je klinicky významná, protože rozdíl mezi léčbami je statisticky významný. Klinickou významnost však nelze vždy odvodit ze statistické významnosti. Klinicky významný rozdíl je většinou dán klinickou zkušeností a nelze jej z pouhé statistické významnosti jednoduše odvodit. Například změna laboratorního výsledku o 1 %, pokud je přítomna u dostatečného počtu jedinců, bude statisticky významná, to však neznámá, že bude významná i klinicky. U daného onemocnění bude za klinicky významnou považována změna např. o 10 % [Sedgwick, 2014].

## 1.7 Anti-Mülleriánský hormon (AMH)

### 1.7.1 Objev AMH

Existenci látky nazvané Müllerian inhibiting substance (MIS), dnes známou jako Anti-Mülleriánský hormon, poprvé předpokládal francouzský endokrinolog a vědec v oblasti fetální endokrinologie Alfréd Jost (1916–1991). Došlo k tomu více než tři desetiletí předtím, než byl tento gonadální glykoprotein purifikován a jeho gen a promotor sekvenovány. Jostův výzkum ukázal, že mužské vlastnosti musí plodu vnutit testikulární hormony – testosteron a AMH, a že v nepřítomnosti nebo neúčinnosti těchto hormonů se plod stává fenotypicky ženským. U mužského plodu dochází pod vlivem testikulárních androgenů k vývoji Wolffových vývodů, ze kterých se formuje epidydimis, vasa deferentia a vesiculae testicularis. Jost si všiml, že krystal testosteron propionátu byl schopen maskulinizovat Wolffovy vývody u ženského plodu, ale neovlivnil Müllerovy vývody, které tvořily tuba uterina, uterus a horní třetinu vaginae [Jost, 1953].

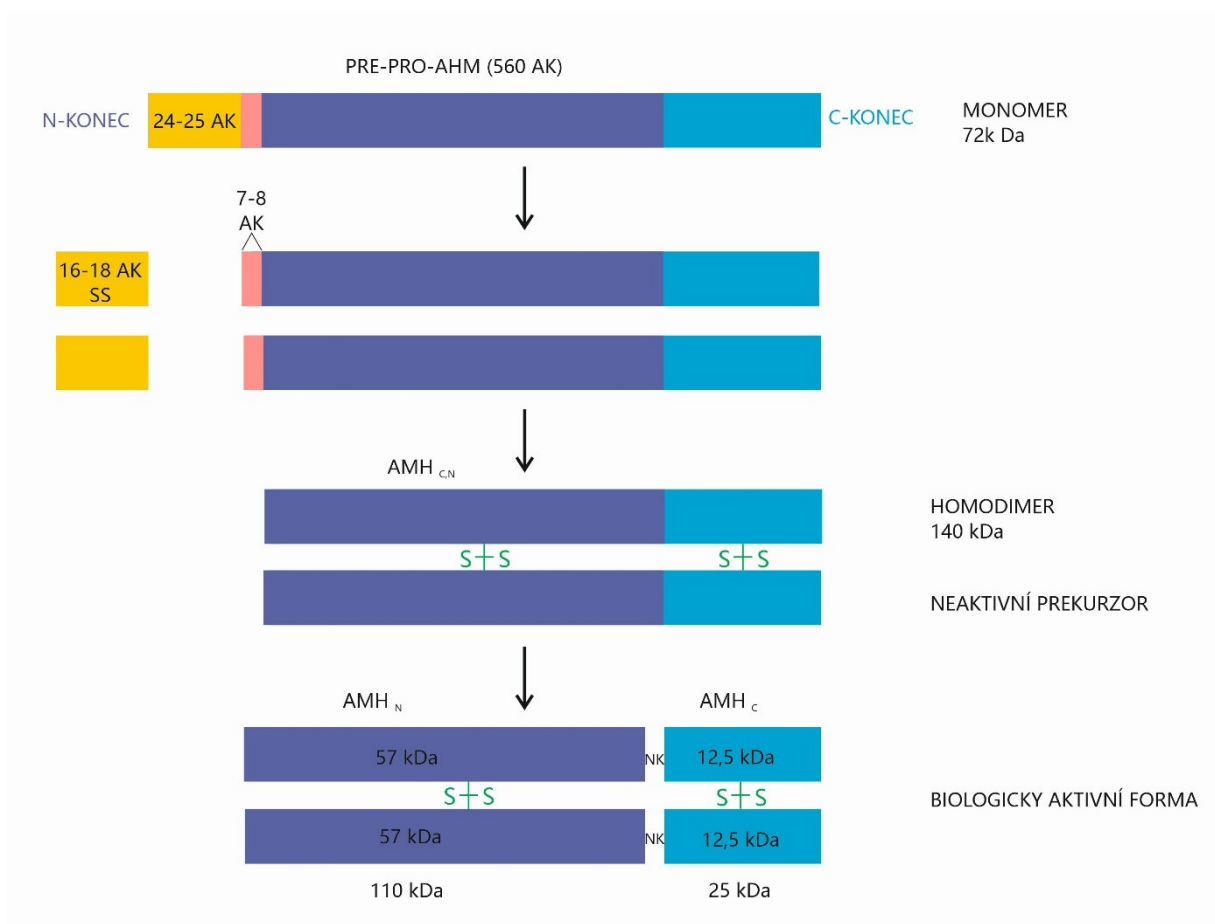
V roce 1984 byl purifikován vlastní protein AMH, a to imunochromatografií z varlat nově narozených telat [Picard and Josso, 1984]. V roce 1986 Richard Cate izoloval a sekvenoval lidské a hovězí geny pro AMH, tedy 33 let poté, co Jost existenci této látky předpokládal [Cate et al., 1986]. Ten samý rok byla také klonována a exprimována hovězí cDNA pro AMH Jean-Yves Picardem [Picard et al., 1986]. Od tohoto okamžiku začíná éra v historii AMH charakterizovaná rychlým nárůstem znalostí o jeho biologických účincích, mechanismech účinku, normální a patologické expresi. Naklonováním specifického receptoru pro AMH typu II v roce 1994 začala být odhalována signální dráha AMH [di Clemente et al., 1994; Baarends et al., 1994].

### 1.7.2 Struktura AMH

Anti-Mülleriánský hormon je glykoproteinový homodimer patřící do superrodiny transformačních růstových faktorů  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Jde o rodinu zahrnující kolem 60 proteinů, které se podílejí na regulaci proliferace, diferenciaci, apoptózy, motility, adheze a rovněž regulují expresi složek extracelulární matrix (stimulací sekrece a inhibicí degradace) [Lee and Massagué, 2022]. AMH je složený ze dvou monomerů spojených disulfidickými můstky s molekulovou hmotností každé podjednotky 72 kDa. Monomer je syntetizován jako prekurzor (pre-pro-AMH) o délce 560 aminokyselin v Sertoliho buňkách varlat v prenatálním i postnatálním období u mužů a v granulózových buňkách vaječníků v postnatálním období u žen [Silva and Giacobini, 2021; Rey et al., 2003].

Pre-pro-AMH obsahuje 24–25 aminokyselinovou vedoucí sekvenci, z níž je 16–18 aminokyselin sekvencí signální (SS), a předpokládanou 7–8 aminokyselinovou zbytkovou prosekvenci. Hydrofobní SS, obvykle umístěná na N-konci proteinu, slouží k navádění nově vznikajícího proteinu do endoplazmatického retikula (ER). SS je rozpoznána ribonukleoproteinem tzv. signal recognition particle (SRP), který zpomalí translaci, dokud není celý komplex pevně zakotven na membráně ER. SS je schopna otevřít translokační kanál pro rostoucí peptid. SRP se SS zůstávají připojeny na membráně, takže se protein zasunuje do ER jako smyčka. Poté dojde k odštěpení naváděcí SS signální endopeptidázou a protein je v ER postupně glykosylován [Matouš et al., 2010]. Také AMH je po své biosyntéze chemicky modifikován jako většina proteinů, a to glykosylací a proteolytickou úpravou (processingem). Při processingu se specifickou proteázou vyštěpuje určitá část

primárního translačního produktu. Proteolytické úpravy jsou vždy nevratné a mohou pokračovat i mimo buňku [Cate et al., 1986]. Po proteolytickém štěpením pre-pro-AMH se poskládá homodimer pro-AMH, 140kDa biologicky neaktivní prekurzor. Poté pro-AMH podléhá dalšímu proteolytickému štěpení, čímž se získá biologicky aktivní forma AMH. Ta je složená z 25 kDa karboxylového C-konce homodimeru, tvořeného dvěma 12,5 kDa identickými monomery, a ze 110 kDa amino N-konce homodimeru, tvořeného dvěma 57 kDa podjednotkami. Podjednotky jsou nekovalentně vázány disulfidickými můstky [Nelson et al., 2019]. Tyto homodimery se běžně nazývají AMH-C,N (obrázek 2). C-terminální doména řídí biologickou aktivitu AMH, zatímco jeho N-terminální doména zvyšuje aktivitu C-konce tím, že pravděpodobně přispívá ke správnému sbalení a sestavení proteinu během syntézy [Wilson et al., 1993]. Právě tato AMH-C oblast sdílí homologii s oblastí členů superrodiny TGF- $\beta$  [Lee and Massagué, 2022].



**Obrázek 2 – Biosyntéza a processing AMH**  
[Vrzáková, 2023]

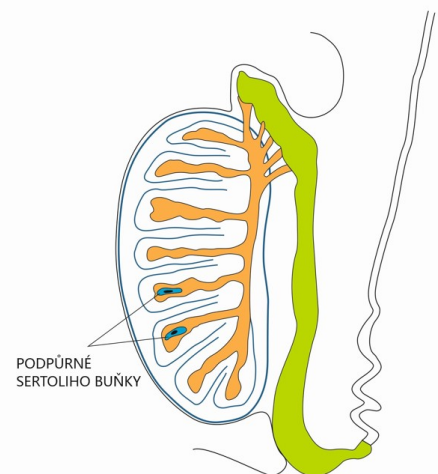
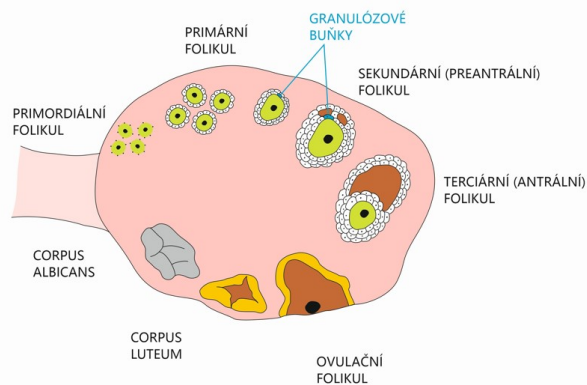
Gen pro AMH se nachází na krátkém raménku chromozomu 19, lokus 19p 13.3 [Cohen-Haguenauer et al., 1987]. Je dlouhý 2750 bp a obsahuje 5 exonů. 3'konec pátého exonu kóduje bioaktivní část molekuly, která je extrémně bohatá na GC [La Marca and Volpe, 2006]. Mutace v tomto genu mají za následek syndrom perzistujícího Müllerova vývodu, tj. přítomnost zakrnělé dělohy, vejcovodů a horní části pochvy u chlapců [Lindhardt Johansen et al., 2013].

Biologicky aktivní nekovalentně vázaný komplex AMH působí na buňky gonád a Müllerových vývodů prostřednictvím dvou typů receptorů: transmembránového MIS receptoru typu I (MISRI) a signálního MIS receptoru typu II (MISRII). C-konec AMH se specificky váže na MISRII, také označovaný jako AMHR2, který má serin/threonin kinázovou aktivitu. Tento receptor obsahuje 573 aminokyselin, tvoří homodimer, má extracelulární doménu, která interaguje s AMH, a intracelulární doménu, která interaguje s homodimerem MISRI. Vzniká aktivní tertramerní receptorový komplex ligand AMH-MISRII-MISRI, což vede k aktivaci proteinů rodiny Smad regulujících genovou expresi. Smads proteiny se řadí do rodiny intracelulárních signálních mediátorů, které spadají do tří širokých kategorií sestávajících z R-Smads (receptorem regulované Smads), Co-Smads (koaktivátorových Smads) a I-Smads (inhibičních Smads). Jde o latentní cytoplasmatické faktory, tzn., že v cytoplazmě jsou v neaktivní formě, po aktivaci jsou translokovány do jádra, kde se mohou vázat na DNA a ovlivňovat tak transkripci genů [Silva and Giacobini, 2021; Clarke et al., 2001].

Gen receptoru AMHR2 je lokalizován na chromozomu 12. Také mutace v tomto genu mohou mít za následek syndrom perzistujícího Müllerova vývodu [Lindhardt Johansen et al., 2013].

### 1.7.3 Fyziologie AMH

AMH se tvoří v Sertoliho buňkách varlat prenatalně i postnatálně. Pomocí specifických protilátek byl AMH nalezen v Sertoliho buňce v drsném endoplazmatickém retikulu a v Golgiho aparátu [Hayashi et al., 1984; Tran and Josso, 1982]. U žen dochází k produkci AMH postnatálně v buňkách membrana granulosa ovarii (obrázek 3). AMH hraje roli v diferenciaci pohlaví embrya. Řídí totiž diferenciaci mužských vnitřních genitálií a také spermatogenezi. Indukuje regresi Müllerových vývodů, zatímco testosteron vylučovaný z Leydigových buněk indukuje vývoj Wolffových vývodů, z nichž se tvoří vnitřní mužské genitálie. Absence AMH u plodu ženy způsobuje vývoj Müllerových vývodů a nepřítomnost androgenů vede k regresi vývodů Wolffových, což má za následek tvorbu ženských genitálií [Silva and Giacobini, 2021; Rudnicka et al., 2021; Clarke et al., 2001].



**Obrázek 3 – Vývoj folikulů v ovariu, produkce AMH v ovariu a testes**  
[Upraveno podle Čihák, 2013]

### 1.7.4 Role AMH při diferenciaci pohlaví

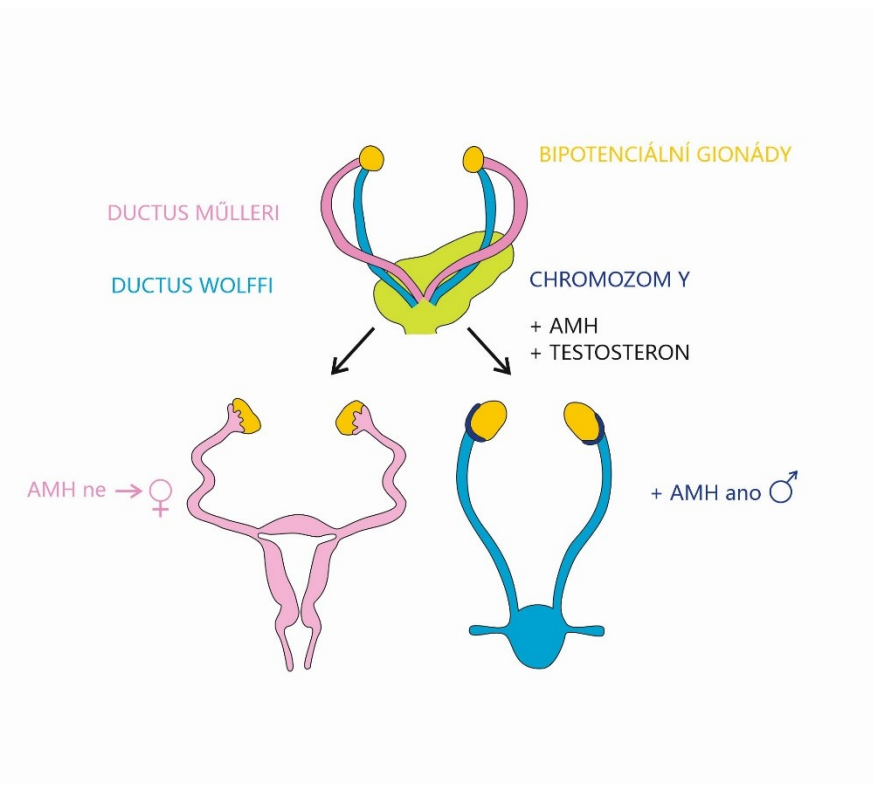
Pohlaví plodu je geneticky určeno již při splnutí vajíčka a spermie (s chromozomem X nebo Y). Mužské pohlaví je dáno karyotypem XY a ženské XX. Na počátku (okolo 12. dne vývoje) jedinou morfológickou známku pohlaví je u ženského pohlaví přítomnost a u mužského pohlaví nepřítomnost Baarova tělíska. Baarovu tělíska se také říká sex chromatin a jde vlastně o inaktivovaný chromozom X. Do konce 6. týdne vývoje savců mají plody obou pohlaví bipotenciální gonády a dva páry vývodů: vývod mesonephros neboli ductus mesonephricus Wolffi a vývod paramesonephros čili ductus paramesonephricus Mülleri. Tomuto stadiu vývoje pohlavního systému, které je shodné pro obě pohlaví, říkáme indiferentní [Slípka and Tonar, 2020].

Ve druhé fázi vývoje se nejprve sexuálně diferencují pohlavní žlázy (gonády), a poté vývodné pohlavní cesty a zevní genitál [Slípka and Tonar, 2020].

U mužů je diferenciaci gonády na varle iniciována genem SRY (Sex determining Region of the Y chromosome). Jde o gen nacházející se na krátkém raménku chromozomu Y, kódující transkripční faktor TDF (testicular determination factor). Tento TDF se váže do specifických oblastí DNA a navozuje expresi genů, což spouští kaskádu dějů vedoucích k vývoji varlete a regresi ženských pohlavních cest. Pokud je tedy přítomen chromozom Y a gen SRY je exprimován, dochází k diferenciaci gonády ve varle. Tento gen totiž expresí autozomálního genu SOX9 podporuje diferenciaci Sertoliho buněk a také aktivuje expresi dalších genů nutných pro vývoj varlat [Rey et al., 2003]. Sertoliho buňky dále produkují další signální molekuly, které stimulují migraci Leydigových buněk do základu varlete. Další faktory stimulují expresi genů v Leydigových buňkách nutných k tvorbě testosteronu, jehož sekrece začíná od 9. týdne vývoje pohlaví. Další signální molekulou produkovanou v Sertoliho buňkách je AMH [Clarke et al., 2001]. AMH je vylučován lidským varletem od šestého týdne gestačního věku (osmý týden amenorey) a jeho exprese je nezbytná pro regresi Müllerova vývodu. Syntéza testosteronu je nezbytná pro udržení Wolfova vývodu, ze kterého se vyvíjí ductus deferens (chámovod), z něj poté glandulae vesiculosae

(měchýřkové žlázy), a corpus a cauda epididymis (tělo a ohon nadvarlete) (obrázek 4) [La Marca et al., 2009; Clarke et al., 2001]. Ductus Mülleri zaniká a zůstává z něj zachován jen rudimentární útvar v podobě appendix testis a utriculus prostaticus [Čihák, 2013].

Pokud chybí chromozom Y a gen SRY tedy není přítomný, diferencuje se gonáda ve vaječník. Nedostatek podpory testosteronem u žen má za následek degeneraci Wolffova vývodu a nepřítomností AMH se udržuje Müllerův vývod, který se vyvíjí do tuba uterina (vejcovod), uterus (děloha) a fornix vaginae (poševní klenba) (obrázek 4). Ze zaniklého ductus Wolffii zůstává jen canalis Gartneri a ductus longitudinalis epoophori [Čihák, 2013]. U plodů obou pohlaví jsou v době, kdy je spuštěna sexuální diferenciace přítomny Müllerovy vývody a také je exprimován specifický AMH receptor. Je to tedy produkce AMH varlaty, která je zodpovědná za zahájení regrese Müllerova vývodu vazbou na AMHR2 receptor a spuštění apoptózy buněk ve stěně Müllerova vývodu, což má za následek jeho regresi a nemožnost jeho diferenciace u plodu mužského pohlaví [Rey et al., 2003].



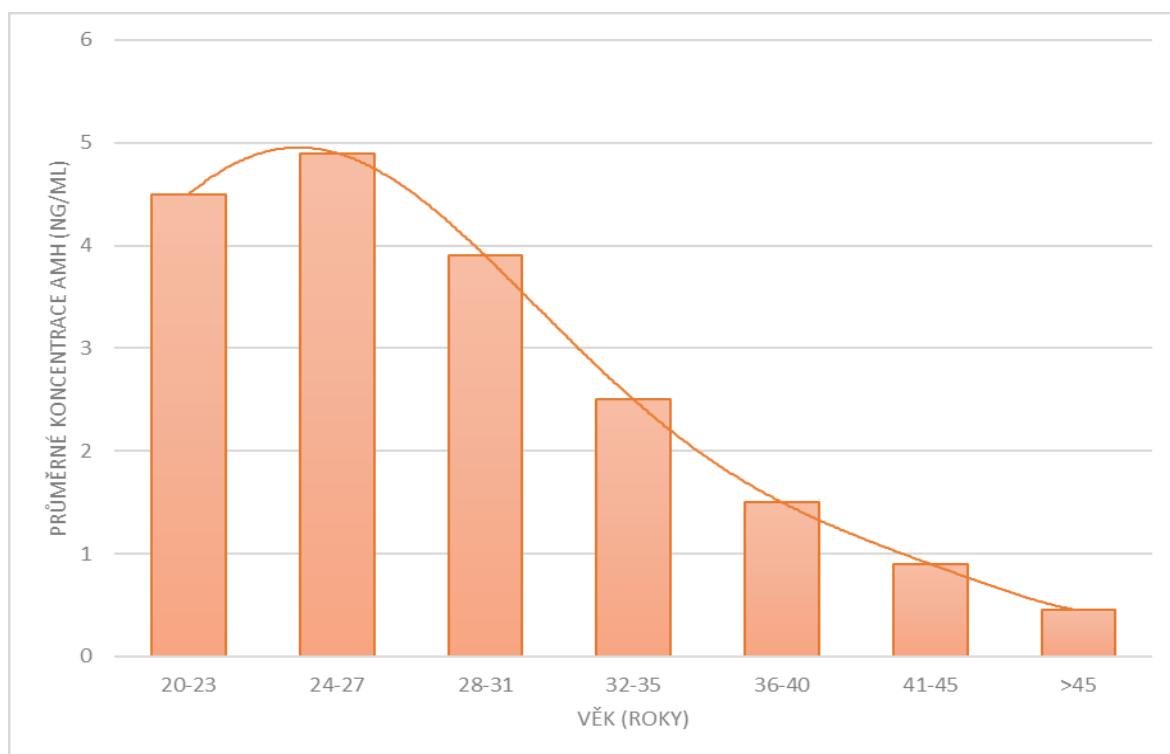
**Obrázek 4 – Sexuální diferenciace lidského plodu**  
[Vrzáková, 2023]



### 1.7.5 Postnatální funkce AMH

U mužů zůstává hladina AMH vysoká od narození do puberty a poté klesá zároveň se zvyšující se koncentrací testosteronu. AMH ovlivňuje u chlapců pohlavní zrání, v období puberty přebírá tuto funkci testosteron. U dospělých mužů jsou hladiny AMH velmi nízké [Grinspon and Rey, 2010].

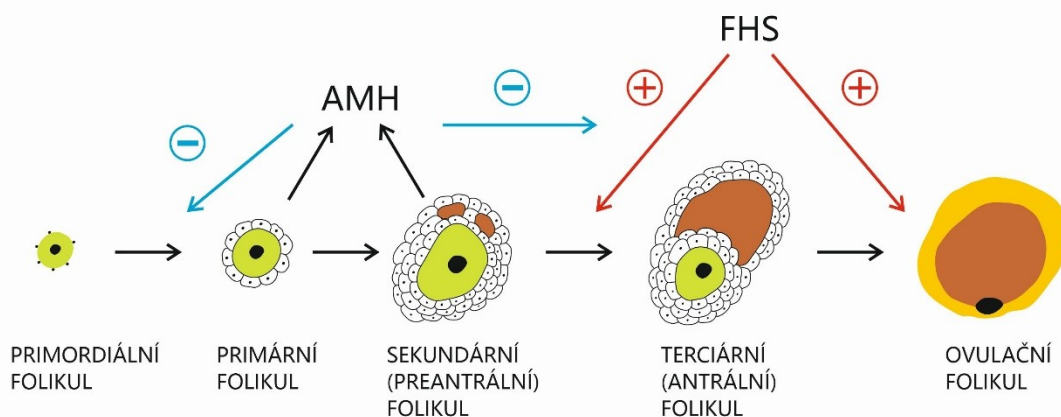
Také u žen byla exprese AMH pozorována, a to přibližně ve 32. týdnu gestace v granulózových buňkách primárních folikulů, také preantrálních (sekundárních) a malých antrálních (terciálních, do 6 mm v průměru) folikulů ve vaječníku. Těmito buňkami je AMH produkováno až do menopauzy. Exprese AMH v primordiálních folikulech pozorována nebyla [Weenen et al., 2004]. Hladina AMH je u dívek po narození velmi nízká, se dvěma malými vzestupy kolem druhého a osmého roku. Od dvanáctého roku života ženy se produkce AMH postupně zvyšuje, vrcholí mezi 25. – 27. rokem života ženy a následně klesá s klesajícím počtem folikulů. Během menopauzy je koncentrace AMH v séru ženy prakticky nezjistitelná [Broekmans et al., 2008]. Průměrné maximální hodnoty AMH v séru žen jsou zjištěné asi ve 25. roce života a pohybují se kolem 5 ng/ml (obrázek 5) [Kučera et al., 2013].



**Obrázek 5 – Koncentrace AMH v séru u žen ve fertilním věku**  
[Kučera et al., 2013]

Ve fyziologickém ovariálním cyklu, během fáze nezávislé na FSH, je exprese AMH nižší v primárních folikulech a nejvyšší v sekundárních (preantrálních). V terciálních (velkých antrálních) folikulech větších než 8 mm je jeho produkce velmi nízká. Ve fázi závislé na FSH je exprese AMH blokována. V atretických folikulech není detekována žádná exprese AMH. AMH inhibuje přechod z primordiálního do primárního folikulárního stadia (obrázek 6).

Řídí růst malého folikulu a výběr dominantního folikulu, čímž se podílí na regulaci počtu folikulů, které rostou z prvotního poolu. Nedochází tak k předčasnému vyčerpání zásoby primordiálních folikulů. AMH tedy reguluje plynulý přísun folikulů do fáze citlivé na FSH. AMH se spolu s FSH podílí na procesu zrání folikulů, FSH podporuje proces zrání a AMH tento proces inhibuje [Broekmans et al., 2008; La Marca and Volpe, 2006].



**Obrázek 6 – Model působení AMH ve vaječniku**  
[upraveno podle La Marca and Volpe, 2006]

*Legenda: ovariální folikul - černý střed představuje oocyt, bílá oblast představuje vrstvu granulózniích buněk a hnědá oblast představuje folikulární tekutinu v antru. AMH je exprimován v primárních a sekundárních (preantrálních) folikulech, v terciálních (antrálních) folikulech větších než 8 mm je jeho produkce velmi nízká.*

### 1.7.6 AMH – klinické využití

Stanovení AMH v séru u žen se používá především k **odhadu individuální rezervy ovariálních vajíček**, a tedy ke zjištění biologického věku jejich ovarii [Brady and Ginsburg, 2018]. Koncentrace AMH v krvi u dospělých žen odráží počet primárních folikulů vstupujících do růstové fáze jejich životního cyklu, což je úměrné počtu primordiálních folikulů, které ještě zůstávají ve vaječniku nebo v ovariální rezervě [Ledger, 2010]. AMH klesá během reprodukčního života ženy, což odráží neustálý pokles zásoby oocytů/folikulů, a tedy i stárnutí vaječníků [Freeman et al., 2012]. U pacientek s předčasným selháním vaječníků je hladina AMH v krvi nedetekovatelná nebo značně snižená v závislosti na počtu antrálních folikulů ve vaječnicích [La Marca et al., 2009]. Podle zjištěné koncentrace AMH ve folikulární tekutině je tento hormon produkován v menších folikulech, do 4 mm, ve folikulech větších než 8 mm je jeho produkce velmi nízká. Ultrazvukem se však dají rozlišit folikuly větší než 2 mm. Doporučuje se proto využívat při hodnocení ovariální rezervy jak AMH, tak ultrazvukové vyšetření [Kučera et al., 2013].

Stanovení AMH v séru žen se také používá k **odhadu ovariální odpovědi na hormonální stimulaci během in vitro fertilizace (IVF)** [Moolhuijsen and Visser, 2020; Magnusson et al., 2017]. Jde o odhad rizika vzniku ovariálního hyperstimulačního syndromu (OHSS) ještě před indukcí ovulace. Hladiny AMH jsou základem pro volbu správné strategie léčby neplodnosti, zejména při stimulaci gonadotropiny během IVF [Buratini et al., 2022; Nelson et al., 2019]. Nižší hladina AMH v séru žen stanovená před začátkem stimulace obvykle znamená nižší stimulovatelnost ovarií pacientky gonadotropiny. Vysoká hladina AMH je zase spojena se zvýšeným rizikem vzniku OHSS. Jde o velmi závažnou iatrogeně způsobenou komplikaci u pacientek podstupujících IVF. Podstatou této asistované reprodukční techniky je hyperstimulace ovaria podáváním gonadotropinů. Jde o nutný krok vedoucí k získání více než jednoho vajíčka. OHSS je vystupňovaná reakce organismu pacientek na tuto hormonální stimulaci. Lehké formy OHSS mohou spontánně odeznít, těžké formy však mohou končit fatálně. Lehké a středně těžké formy OHSS byly pozorovány u 15-20 % a těžké formy OHSS se mohou vyskytnout až u 1-3 % všech cyklů [Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008]. Předpokládá se, že umělá stimulace vaječníků a použití exogenního gonadotropinu vede k uvolnění vazoaktivních prozánětlivých mediátorů, jako je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), prostaglandiny a cytokiny. Předpokládá se také, že právě VEGF je tím hlavním zprostředkovatelem klinické manifestace syndromu. Vazbou VEGF na svůj odpovídající receptor VEGFR-2 spouští kaskádu reakcí vedoucí ke zvýšené permeabilitě kapilár s následným únikem tekutiny z intravaskulárního prostoru do intersticia. Tekutina se hromadí v dutině břišní, pohrudniční, případně perikardiální. Dochází k hemokoncentraci, vznikají trombózy, klesá perfuze orgánů, což může vést k jejich selhání. Ojedinele může vyústit tento stav ve smrt pacientky [Marek and Machač, 2005]. Prevence OHSS je ve správném vyhodnocení rizikových faktorů, mezi které patří syndrom polycystických ovarií a dále vysoká sérová koncentrace AMH [Kučera et al., 2013].

Další využití stanovení koncentrace AMH v séru žen se využívá při diagnostice a monitoraci **syndromu polycystických ovarií (PCOS)** [Rudnicka et al., 2021; Teede et al., 2019]. Tento syndrom je charakterizován poruchami menstruačního cyklu (amenorea díky chronické anovulaci), hyperandrogenismem a přítomností polycystických vaječníků při ultrazvukovém vyšetření. Potvrzením klinické diagnózy PCOS je přítomnost alespoň dvou ze tří výše uvedených kritérií. Mezi další projevy PCOS patří hirsutismus a mužský typ alopecie. Tato porucha je nejčastější ženskou endokrinopatií, je diagnostikována u 5–10 % žen v reprodukčním věku a často bývá spojena s porušenou glukózovou tolerancí nebo s výskytem diabetes mellitus 2. typu. PCOS je specifický zvýšeným počtem folikulů ve všech růstových stádiích. Jedná se hlavně o sekundární (preantrální) a malé terciální (malé antrální) folikuly a až dvojnásobně zvýšenou hladinu AMH v séru u 75 % těchto žen, což je v souvislosti právě se zvýšeným počtem folikulů produkujících AMH. Tak vysoká hladina AMH snižuje expresi FSH a syntézu estradiolu, čímž blokuje selekční fázi a tím i tvorbu ovulačního folikulu a potlačuje proces zrání folikulů. Kvůli silné korelaci mezi hladinou cirkulujícího AMH a počtem antrálních folikulů na ultrazvuku, byl AMH navržen jako alternativní marker ovulační dysfunkce u PCOS. Nicméně výsledky ze současné literatury nejsou homogenní a stanovit specifický práh AMH u PCOS je velmi náročné. Proto by stanovení AMH neměl být jediným testem pro diagnostiku PCOS, ale může pomoci, zejména pokud je obtížné vyhodnotit vaječníky při ultrazvukovém vyšetření u obézních, panenských a málo echogenních pacientek [Rudnicka et al., 2021].

AMH je také specifickým senzitivním nádorovým markerem vhodným pro **diagnostiku a monitorování ovariálních granulózních buněčných tumorů (GCT)** již z toho důvodu, že je produkován granulózovými buňkami ovarií od narození až do menopauzy. AMH se používá pro monitorování pacientek, které podstoupily ovariektomii pro GCT. Stanovení AMH umožňuje časnou detekci recidiv. Studie ukazují až desetinásobné zvýšení koncentrace AMH v granulózních buněčných nádorech vaječníků, AMH tedy může sloužit jako senzitivní a specifický marker při sledování pacientek po ovariektomii. GCT sice patří mezi méně časté typy nádorů, ale včasná detekce cirkulujícího AMH má velký význam, protože nádory z granulózních buněk se vyznačují vysokým výskytem recidiv 10 až 20 let po odstranění primárního nádoru [Chang et al., 2009; La Marca and Volpe, 2006].

AMH je také dobrým prediktorem poškození ovariálních folikulů během radioterapie a chemoterapie. Toto poškození je doprovázeno snížením koncentrace AMH v séru, která závisí na typu použitých chemoterapeutik a počtu léčebných cyklů [Anderson and Su, 2020].

AMH se sice primárně používá v gynekologii, ale může se osvědčit i v **pediatrii**, a to v diagnostice poruch diferenciacce pohlavního vývoje u dětí. Stanovení sérové koncentrace AMH se v klinické pediatrii používá různými způsoby ke stanovení přítomnosti testikulární tkáně u pacientů s kryptorchismem, při podezření na anorchii nebo závažnější poruchy sexuálního vývoje (DSD) a u hypogonadotropního hypogonadismu. AMH je dobře přijímaný biomarker Sertoliho buněk pro hodnocení funkce varlat během dětství bez nutnosti stimulačních testů [Kanakatti et al., 2022]. Grispon et al. ve své studii prokázali, že produkce AMH je u prepubertálních chlapců s kryptorchismem (zejména s bilaterálně nesestouplými gonádami) nižší než u normálních chlapců. To je pravděpodobně důsledkem menšího počtu Sertoliho buněk v kryptorchidních gonádách nebo snížené schopnosti Sertoliho buněk vylučovat AMH [Grinson et al., 2018]. Absence AMH nebo jeho extrémně nízká hladina je prediktivní pro nepřítomnou testikulární tkáň (anorchii) [Lee et al., 2003]. Jak již bylo výše zmíněno, koncentrace AMH odrážejí funkci Sertoliho buněk a jsou také často stanovovány ve spojení s měřením testosteronu. Také testikulární dysgeneze je charakterizována nízkými koncentracemi AMH, ale také testosteronu, ve srovnání s normálními muži. AMH byl také studován ve spojení s měřením FSH, LH a testosteronu pro předčasnou (snížené hladiny AMH) a opožděnou (zvýšené hladiny AMH) pubertu u chlapců [Rey et al., 2003]. U prepubertálních dívek výzkumné studie ukázaly, že stanovení AMH pomáhá rozlišovat mezi gonadálními a negonadálními příčinami mírné virilizace. U 46, XX prepubertálních virilizovaných dívek, které mají vaječníky, nebyly detekovány měřitelné hodnoty AMH, což vylučuje přítomnost testikulární tkáně [Lindhardt Johansen et al., 2013].

Extrémně vysoké koncentrace AMH byly nalezeny u dívek s virilizujícími nádory vaječníků ze Sertoli-Leydigových buněk [Lee et al., 2003]. Jedná se o vzácné ovariální nádory, pro které je charakteristická přítomnost Sertoliho a Leydigových nezáradečných podpůrných buněk mužských gonád. Tyto nádory tvoří méně než 0,5 % nádorů vaječniku a asi 1–2 % dětských ovariálních nádorů. Doprovodným příznakem je již výše zmíněná virilizace, tj. rozvoj druhotných mužských pohlavních znaků u žen. Diferencované nádory jsou obvykle benigní, hůře diferencované vykazují maligní chování [Plevová et Geržová, 2019].

### 1.7.7 AMH – stanovení

AMH lze v současnosti stanovit v séru nebo plazmě dvěma metodami: ELISA nebo chemiluminiscenční technikou. První uvedená metoda stanovení AMH v séru je starší, vyvinutá ve druhé polovině 80. let 20. století. Stanovení AMH se nejprve používalo k diferenciální diagnostice narušeného pohlavního vývoje u dětí, v odborné literatuře o tom lze najít zmínky již od roku 1990 [Baker et al., 1990; Hudson et al., 1990; Josso et al., 1990]. Na začátku 21. století se AMH začal stanovit jako marker ovariální rezervy u žen. Tato indikace ke stanovení AMH je mimo jiné, výše zmíněné indikace, používána dodnes. AMH lze stanovit také ve folikulární tekutině, princip stanovení je stejný.

Určitým problémem při stanovení AMH by mohla být molekulární heterogenita cirkulujícího AMH. V krvi se nachází jak biologicky neaktivní prekurzor proAMH, tak proteolyticky upravená biologicky aktivní forma AMH-N a AMH-C. Další problém při stanovení této látky je také zatím málo známá stabilita AMH ve vzorcích během skladování a variabilní citlivost imunoeseje s interferencí komplementu C1q a C3 [Rudnicka et al., 2021].

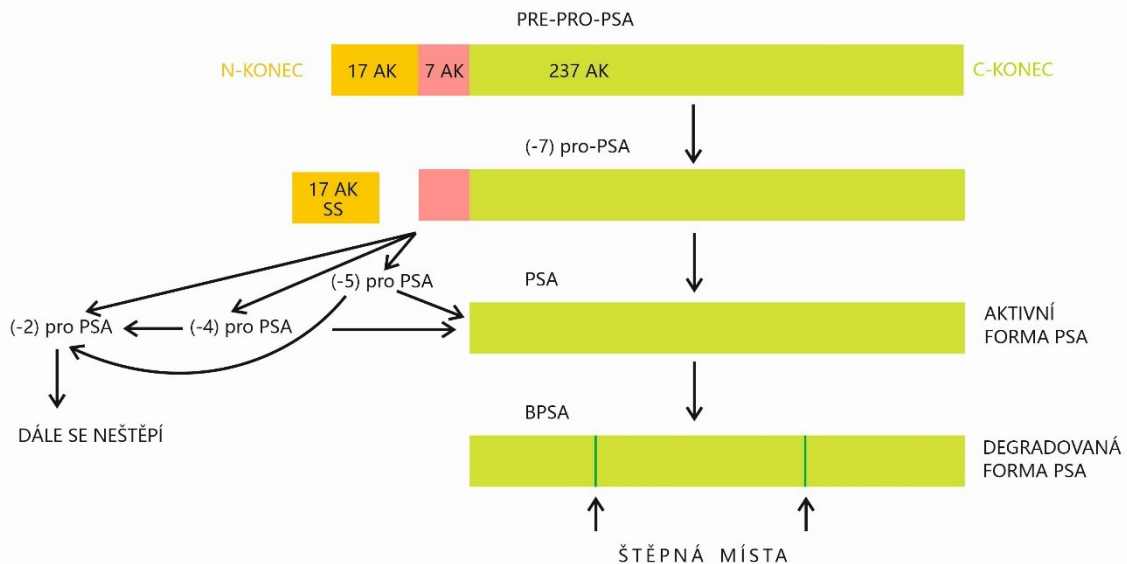
Přestože koncentrace AMH s věkem klesá, studie ukázaly, že každodenní variabilita koncentrací AMH u menstrujících žen je tak nízká, že AMH lze měřit v kterýkoli den během menstruačního cyklu [La Marca et al., 2013]. Podle jiných autorů hladina AMH v séru na fázi menstruačního cyklu nebo na exogenních pohlavních hormonech nezávisí [Lv et al., 2020].

Výsledky studií o vlivu hormonální antikoncepce (HC) na koncentraci AMH v séru nejsou shodné. Podle autorů Rudnické a Landersoe je HC faktor, který ovlivňuje sérovou hladinu AMH. Koncentrace AMH je u žen užívajících HC nižší než u žen, které hormonální antikoncepci nikdy neužívaly a varíruje od 14–55 %. Retrospektivní studie podle Landersoe ukazuje variace hladiny sérového AMH podle druhu hormonální antikoncepce. Například při užívání orální kontracepce nebo hormonální progesteronové pilulky mají tyto ženy o 30–40 % nižší sérovou hladinu AMH. Pro srovnání, ženy, které používají intrauterinní tělísko, mají o 17 % nižší sérovou hladinu AMH. Avšak závislost mezi mírou poklesu hladiny AMH v séru a dávkou hormonů se nepodařilo prokázat [Landersoe et al., 2020; Bentzen et al., 2012]. Starší studie naopak neprokázaly vliv HC na snížení koncentrace AMH v séru [Li et al., 2011].

Také kouření má podle autorů Freour, Fuentes a Sowers vliv na koncentraci AMH. Ženy aktivní kuřačky mají sníženou hladinu AMH v séru a ve folikulární tekutině oproti ženám nekuřačkám. Bylo zjištěno, že u kuřaček dochází také k rychlejšímu poklesu hladin během jejich reprodukčního života. Jakým mechanismem k tomuto snížení dochází, je zatím neznámé [Freour et al., 2012; Fuentes et al., 2012; Sowers et al., 2010].

## 1.8 PSA

Prostatický specifický antigen (PSA) je produkován v prostatické tkáni. Poprvé byl identifikován a purifikován Wangem et al. v roce 1979 [Wang et al., 1979]. PSA je enzym (Enzyme Nomenclature 3.4.21.77), serinová proteáza, známá také jako lidský kalikrein 3 (hk3), složená z 237 aminokyselin v jediném polypeptidovém řetězci s molekulovou hmotností přibližně 34 kDa [Donald et al., 2009]. Gen je umístěn na chromozomu 19. Díky alternativnímu sestřihu tohoto genu existuje několik variant mRNA kódujících různé izoformy enzymu. PSA se syntetizuje jako enzymaticky neaktivní prekurzor (preproenzym) obsahující 17 aminokyselinovou vedoucí SS a 7 aminokyselinovou vedoucí prosekvenci. Odštěpení SS dává vznik neaktivní prekurzorové formě enzymu (proPSA), také označované jako [-7]proPSA. Tato molekula dále prochází posttranslační modifikací jako je glykosylace a processing. K aktivaci dochází proteolytickým štěpením působením proteáz kalikreinů hk2 a hk4, postupně tak vzniká několik prekurzorů: [-5]proPSA, [-4]proPSA a [-2]proPSA. Posledně jmenovaný již nelze dále štěpit (obrázek 7) [Igawa et al., 2014]. Po sekreci do vývodů prostaty je vedoucí propeptid odštěpen a proPSA se tak aktivuje na aktivní formu PSA. Vylučuje se do semenné tekutiny, kde štěpí gelové proteiny seminogelin I a II. Umožňuje tak její zkapalnění a usnadňuje pohyb spermatozoí, což je nezbytné pro úspěšné oplodnění. Imunohistochemické studie ukázaly, že přítomnost PSA je omezena na cytoplazmu prostatických acinárních buněk a duktálního epitelu. Pouze nepatrné množství PSA unikne do krve, kde můžeme změřit koncentraci menší než 4 µg/l. Pro představu, v seminální tekutině se PSA nachází v koncentraci 0,5–5 g/l. Aby se PSA dostal do krve ve větší míře, musí překonat epitel prostaty a endotel cév. Prostup je vyšší, pokud tuto bariéru naruší patologický proces, např. nádor, zánět, benigní hyperplazie prostaty (BHP). Je také zvýšen po zákrocích na prostatě, jako je biopsie a operace prostaty [Hori et al., 2013].



**Obrázek 7 – Biosyntéza a processing PSA**  
[Vrzáková, 2023]

### 1.8.1 Formy PSA přítomné v krvi

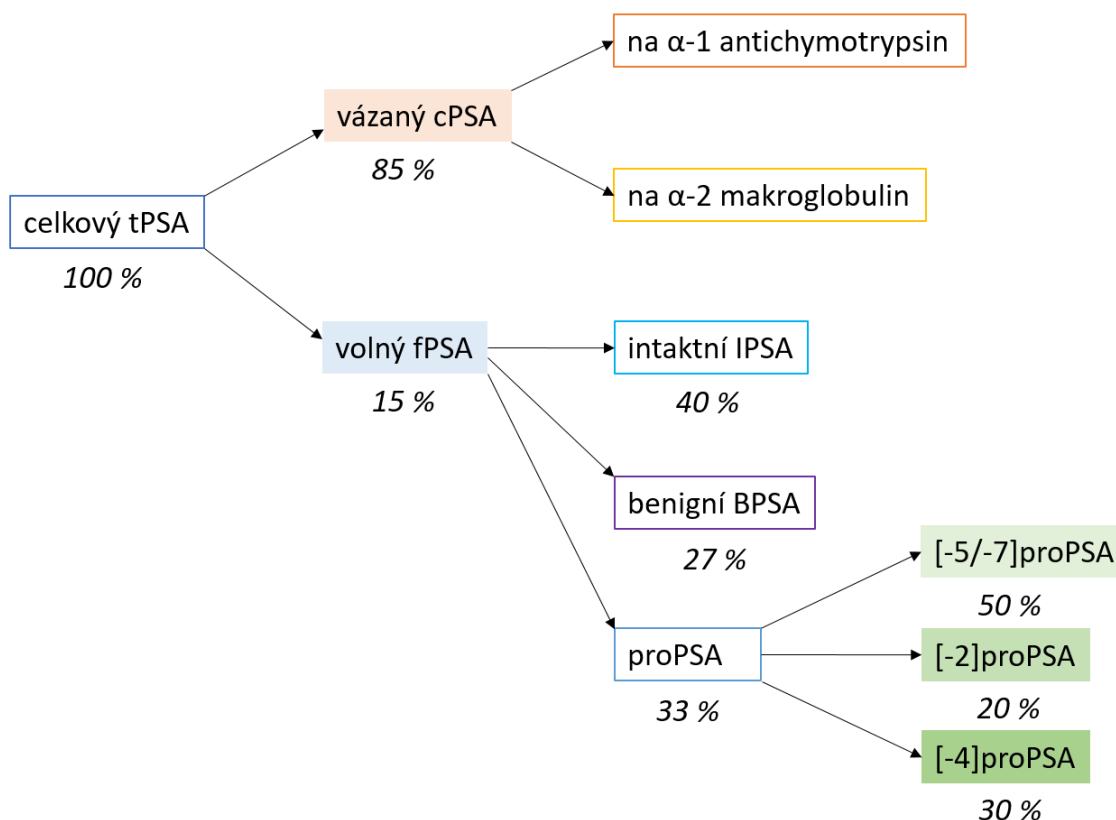
V krvi je PSA přítomen ve 3 hlavních formách:

1. volný fPSA (free PSA), u kterého se rozlišují 3 podformy: BPSA – tzv. s benigní hyperplazií asociovaný PSA, dále proPSA (jeho zkrácené i nezkrácené formy) spojovaný s karcinomem prostaty a intaktní PSA [Hori et al., 2013]. Koncentrace fPSA v séru se obvykle pohybuje od 5 do 35 % koncentrace celkového PSA. Vzhledem k proteolytické enzymatické aktivitě je při uvolnění do krve poměrně rychle vázán na antiproteázy, které brání potenciálně škodlivé proteázové aktivitě PSA [Saini, 2016].

2. PSA vázaný na  $\alpha$ 2-makroglobulin. Tato forma je obvykle nedetekovatelná kvůli nedostatku imunoreaktivity.

3. PSA vázaný na  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. Tato forma tvoří největší podíl z celkového PSA.

Většina imunoreaktivních souprav detekuje imunoreaktivní molekuly PSA volné i vázané na  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. Jde proto o celkový PSA (total PSA, tPSA) [Hori et al., 2013].



**Obrázek 8 – Formy PSA přítomné v krvi**  
[Upraveno podle Hori et al., 2013]

## 1.8.2 Klinický význam stanovení prostatických markerů

### tPSA

V roce 1980 Papsidero et al. jako první uvedli, že PSA je pravidelně detekován v séru pacientů s rakovinou prostaty [Papsidero et al., 1980]. Od 80. let 20. století se celková hladina prostatického specifického antigenu (tPSA) používá jako nádorový, orgánově specifický marker v diagnostice karcinomu prostaty (PCa) [Simanek et al., 2018]. Toto použití má však svá omezení. PSA se totiž nachází v prostatické a seminální plazmě nejen ve zdravé prostatické tkáni, ale také v prostatické tkáni jak hyperplastické, tak i maligní, a dokonce i v metastázách prostatického původu [Hori et al., 2013].

V současné době se prakticky neprovádí screening rakoviny prostaty pouze pomocí stanovení tPSA. Nelze totiž odhadnout agresivitu nádoru a často tak docházelo k over terapii (zbytečnému zahájení léčby). Nízká specifická tPSA také vedla k over diagnostice (nadměrnému počtu diagnostických výkonů, v tomto případě hlavně biopsií prostaty) [Fuchsová et al., 2013].

Stanovení tPSA je indikováno k:

- selektivnímu screeningu a časně diagnostice PCa
- diferenciální diagnostice PCa
- monitoraci onemocnění PCa
- monitoraci léčby po radikální prostatektomii a monitoraci medikamentózní léčby PCa.

**Tabulka 1 – Referenční hodnoty tPSA v séru**  
[Oddělení imunochemické diagnostiky FN Plzeň]

Hodnotící meze	Koncentrace tPSA v séru (µg/l)
Muži do 39 let	0–2,0
40–50 let	0–2,5
51–60 let	0–3,5
61–70 let	0–4,5
nad 70 let	0–6,5

Koncentrace tPSA 4–10 µg/l je považována za oblast hraničních hodnot [Khan et al., 2003].



## fPSA

Od 90. let se fPSA používá jako druhý parametr v případě diagnostiky karcinomu prostaty [Filella et al., 1995]. fPSA není používán sám o sobě, ale slouží pro výpočet poměru volné frakce PSA k celkovému PSA vyjádřené v procentech:

$$\% \text{ freePSA} = \left( \frac{f\text{PSA}}{t\text{PSA}} \right) \times 100$$

Protože toto vyjádření není v souladu se soustavou jednotek SI a správně by měl být výsledek vyjádřen jako bezrozměrné číslo, do klinické praxe se zavádí vyjadřování výsledku jako:

*poměr fPSA/tPSA v séru*

Tento poměr je používán pro diferenciální diagnostiku benigních a maligních postižení prostaty, zejména při hodnotách tPSA v rozmezí 4–10 µg/l. Nehodnotí se výsledná koncentrace, ale poměr koncentrací. Vyšší výsledky tohoto poměru v séru korelují s nižším rizikem karcinomu prostaty, se snižující se hodnotou tohoto poměru se zvyšuje pravděpodobnost maligního tumoru [Jung et al., 2000]. Poměr nad 0,25 je považován za normální, poměr pod 0,10–0,15 je mnohem více spojován s PCa.

**Tabulka 2 – Referenční hodnoty fPSA/tPSA v séru**  
[Oddělení imunochemické diagnostiky FN Plzeň]

<i>poměr fPSA/tPSA v séru</i>	Hodnocení
nad 0,25	benigní onemocnění
0,15–0,25	šedá zóna
0–0,15	maligní nádor

## [-2]proPSA

Jedná se o zkrácenou izoformu proPSA, která obsahuje vedoucí prosequenci jen o dvou aminokyselinách místo obvyklých sedmi. Tato forma [-2]proPSA není dále štěpena. Nebyla nalezena v seminální tekutině, uniká tedy z prostaty do krve, kde se nachází ve zvýšené koncentraci u mužů s rakovinou prostaty. Zkrácené formy proPSA jsou zvýšené v periferní zóně tkáně karcinomu v porovnání s benigní hyperplazií prostaty (BHP). Mohou být ale zvýšené i u akutních a chronických zánětů prostaty [Mikolajczyk et al., 2000].

Ve studiích u mužů s PCa potvrzeným biopsií bylo prokázáno, že [-2]proPSA v rozmezí hodnot tPSA 2,0–10 µg/l zlepšuje specifitu pro detekci rakoviny ve srovnání se samotným %fPSA, zatímco stanovení [-5,-7]proPSA neprokázalo lepší rozlišení mezi PCa a BHP [Semjonow et al., 2010].

Stanovení [-2]proPSA je indikováno k:

- diagnostice hypertrofie prostaty, rozhodnutí o biopsii, rebiopsii
- diferenciální diagnostice benigní hyperplazie prostaty a PCa.

Samostatné hodnoty stanovení [-2]proPSA se pro interpretaci nepoužívají [Fuchsová et al., 2014].

## PHI

Jedná se o matematický model hodnocení výsledků prostatických biomarkerů stanovovaných v séru, ve snaze zvýšit efektivitu diagnostického procesu. Rovnice kombinující [-2]proPSA, fPSA a celkové PSA se nazývá Prostate Health Index tzv. Index zdraví prostaty (PHI) a od roku 2012 je schválena pro vyšetření u pacientů s negativním per rectum nálezem a hodnotou tPSA 4–10 µg/l. Toto vyšetření je již od roku 2017 hrazeno zdravotními pojišťovnami [Fuchsova et al., 2015; Fuchsová et al., 2014].

$$PHI = \left( \frac{[-2]proPSA}{fPSA} \right) \times \sqrt{tPSA}$$

Výsledky PHI podle řady zahraničních i českých publikovaných studií velice dobře korelují s Gleason skóre [Anyango et al., 2021, Lamy et al., 2018]. Jde o histopatologické hodnocení buněk prostaty získané biopsií tkáně. Měření [-2]proPSA a výpočet PHI výrazně zvyšují spolehlivost diferenciální diagnostiky PCa [Fuchsova et al., 2015]. Umožňují zhodnotit riziko pro pacienta a snížit tak počet biopsií a rebiopsií prostaty. Rovněž urychlují diagnostiku u nemocných s vysokou hodnotou tPSA a negativní biopsií [Catalona et al., 2011].

Hodnota PHI 40 se bere jako pozitivní, ale tzv. šedá zóna leží mezi hodnotami 30–40. Také hodnota PHI nad 30 již může znamenat přítomnost PCa u pacienta. Někteří autoři navrhuji na základě provedených studií používat jako mezní hodnotu PHI 37 [Boegemann et al., 2016; Fuchsova et al., 2015].

Výše zmíněné parametry, zejména PHI, přispěly k hodnocení agresivity PCa pomocí biochemických metod [Maxeiner et al., 2017].

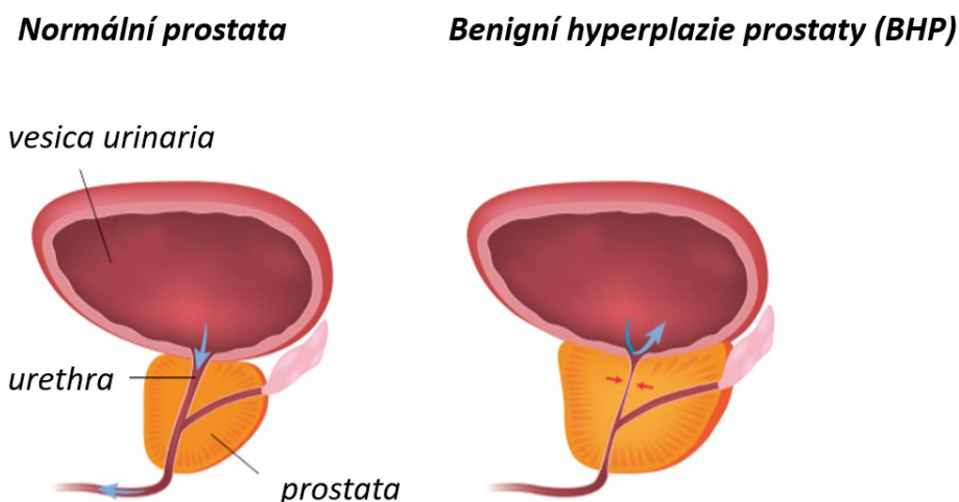
**Tabulka 3 – Referenční hodnoty PHI v séru**  
[Oddělení imunochemické diagnostiky FN Plzeň]

$PHI = \left( \frac{[-2]proPSA}{fPSA} \right) \times \sqrt{tPSA}$	Hodnocení
0–30	benigní onemocnění
30–40	šedá zóna
nad 40	maligní nádor

### 1.8.3 Benigní hyperplazie prostaty

**Prostata**, přídatná mužská pohlavní žláza, je uložena kolem začátku uretry, těsně pod močovým měchýřem. Uretra rozděluje prostatu na přední menší preuretrální část a zadní větší retrouretrální část. Na zadní straně uretry ústí dva ductuli ejaculatorii a 15–30 vývodů prostatických žlázek. Povrch prostaty tvoří dvouvrstvý vazivový obal capsulae periprostatica et propria. Prostata se skládá z hladké svaloviny, vazivového stroma a 30–50 tuboalveolárních žlázek. Podle různého zastoupení výše uvedených složek se rozeznává několik zón prostaty: zóna periuretrální (obklopuje uretru, obsahuje slizniční žlázy), vnitřní neboli centrální (za periuretrální zónou, obsahuje submukózní žlázy), vnější neboli periferní (obsahuje hlavní žlázy ve fibromuskulárním stromatu), zóna přechodní a preuretrální (tvořená jen vazivem a svalovinou, bez žlázek). Žlázy jednotlivých zón jsou různého vývojového původu [Balko et al., 2017]. Funkce prostaty je tvorba lehce alkalického sekretu o pH kolem 7,3 obsahující vápníkové a fosfátové ionty, Zn, kyselinu citronovou, prostaglandiny, spermin a spermidin, Ig, ACP a PSA. Vše slouží jednak k výživě spermií a také ke zkapalnění ejakulátu, čímž se usnadňuje pohyb pohlavních buněk. Prostata také tvoří mechanickou ochranu spojení ductus ejaculatorius s pars prostatica urethrae. V činnosti udržuje prostatu testosteron, který se zde mění na dihydrotestosteron (účinnější formu) enzymem 5- $\alpha$ -reduktázou. Průměrná hmotnost prostaty je 20–35 g při velikosti 4x3x2 cm [Čihák, 2013].

**Benigní hyperplazie prostaty (BHP)** je nezhoubné zvětšení prostaty, při kterém dochází ke zvětšování stromálních žlázek. Jedná se o nejčastější urologické onemocnění mužů, ke kterému dochází v důsledku neregulovaného hyperplastického růstu epiteliálních a fibromuskulárních tkání v přechodní a periuretrální zóně (obrázek 9) [Devlin et al., 2021].



**Obrázek 9 – Benigní hyperplazie prostaty**

[upraveno podle <https://www.urogyn.cz/benigni-hyperplazie-prostaty-diagnostika-a-moznosti-lecby/>]

Se zvyšujícím se věkem se prostata zvětšuje a mění díky hormonálním vlivům testosteronu a estrogeneru. Dochází k útlaku uretry či vyklenování zvětšené prostaty do močového měchýře, na což močový měchýř reaguje postupnou změnou složení své stěny. Prostata může dosahovat až několikanásobku průměrné hmotnosti, i přes 200 g. V pokročilých stádiích může dojít až k zástavě močení, nevratnému poškození funkce močového měchýře a ledvin. BHP však nemusí vůbec nebo dlouho způsobovat pacientovi klinické obtíže. Klinické projevy, které pacient vnímá, jsou nejčastěji mikční symptomy dolních cest močových (LUTS – low urinary tract symptoms). Jedná se zejména o obstrukční příznaky, mezi které patří: náhlé a časté nutkání na močení i v noci, slabý proud moči, nutnost tlačit při mikci přes břišní lis, pocit nedostatečného vyprázdnění močového měchýře, zadržené a přerušované močení [Janů et al., 2022]. Je však nutné si uvědomit, že přítomnost LUTS neznamena vždy přítomnost BHP. Nejčastějšími příčinami LUTS kromě BHP jsou: prostatitida, karcinom prostaty a stavy obstrukce dolních močových cest (striktura uretry a skleróza hrdla močového měchýře). Dalšími možnými příčinami LUTS jsou: záněty dolních cest močových nebo přítomnost cystolitíazy. Neodmyslitelnou součástí vyšetření spolu s odebranou anamnézou, fyzikálním vyšetřením zahrnujícím vyšetření per rectum je vyšetření biochemické, a to vyšetření moči a stanovení tPSA [Klečka and Hora, 2007].

#### **1.8.4 Karcinom prostaty**

PCa je vysoce heterogenní onemocnění, od klinicky nevýznamného až po vysoce agresivní, kastročně rezistentní typ nádorů [Klotz et al., 2015]. Podle Světové zdravotnické organizace byl karcinom prostaty v roce 2022 již druhým nejčastějším typem rakoviny u mužů (po rakovině plic) a osmou příčinou úmrtí na rakovinu [WHO, 2024]. Incidence standardizovaná podle věku je nejvyšší v severní Evropě a nejnižší v jižní střední Asii. Muži afrického původu jsou k této nemoci náchylnější ve srovnání s jinými etniky. Míra úmrtnosti se výrazně liší od míry výskytu, přičemž nejvyšší hodnoty jsou v Karibiku, subsaharské Africe a Mikronésii/Polynésii [Giona, 2021]. Západní země s vyšším indexem lidského rozvoje (HDI) se potýkají s obzvláště vysokým výskytem tohoto onemocnění, které může být způsobeno faktory životního prostředí a životního stylu, ale také širším screeningem. Na druhou stranu byla vyšší mortalita hlášena v zemích s nižším HDI. Trvale se zlepšující diagnostika a léčba PCa způsobuje rozdíl mezi trvale rostoucím počtem diagnostikovaných případů PCa a stabilní či dokonce mírně klesající úmrtností [Giona, 2021]. Podle údajů Národního onkologického registru z roku 2023 byl v období let 2017–2021 v ČR střední věk nově nemocných 69 let, 50 % pacientů bylo ve věku 64–74 let. V roce 2021 činil počet nově zachycených karcinomů prostaty v ČR 7 751, tj. 149,8 případů na 100 000 mužů. Šlo o 8,2% navýšení oproti roku 2020. Úmrtnost na PCa byla v roce 2021 27,6 případů na 100 000 mužů, jednalo se o 6,4% pokles oproti roku 2020 [Krejčí et al., 2023].

#### ***Etiologie***

Během posledních dvaceti let byla provedena celá řada studií posuzujících různé vlivy na vznik tohoto nádoru. Faktory ovlivňující vznik PCa shrnuje tabulka 4. Na prvním místě je uvedena pozitivní rodinná anamnéza (výskyt PCa u příbuzného). Ta je spojena se zvýšeným výskytem PCa, což svědčí o genetické predispozici (jedná se většinou o jednonukleotidové polymorfismy tzv. SNP a také o mutace BRCA1,2). U mužů s příbuznými s PCa lze odhadnout jejich zvýšené riziko PCa podle věku. Dědičný PCa je spojen s nástupem nemoci o šest až sedm let dříve, ale agresivita a průběh nemoci se jiným způsobem neliší. Dalším důležitým faktorem je věk. S rostoucím věkem se zvyšuje i počet

zachycených nádorů. Nejčastěji je PCa zjištěn u mužů ve věku 65–79 let. Vzhledem k pomalému růstu většiny typů nádorů prostaty je ale u starších pacientů také větší pravděpodobnost, že délka jejich života nebude PCa ovlivněna. Nicméně se PCa může vyskytnout i v mladším věku. Nezanedbatelnou úlohu u mnoha nádorů včetně PCa má imunosenescence (postupné stárnutí imunitního systému). Z dalších rizikových faktorů vzniku PCa je potřeba uvést toxické prostředí [Kucera et al., 2020]. Podle několika studií se jedná hlavně o vliv chlordekonu (insekticid, perzistentní organická látka, v ČR se nevyrábí ani nepoužívá), pesticidů, Bisfenolu A, těžkých kovů jako je Cd a dále také As, Zn, Mn a Sb [Alabed Alibrahim et al., 2020; Pardo et al., 2020; Lim et al., 2019; Mezynska and Brzóska, 2018; Tse et al., 2017]. Další faktory přispívající ke vzniku PCa se dají obecně shrnout jako nezdravý životní styl [Kucera et al., 2020].

**Tabulka 4 – Faktory ovlivňující PCa**  
[Kučera et al, 2020]

<b>Rizikové faktory vzniku karcinomu prostaty</b>	<b>Cílová prevence</b>
Vrozená genetická predispozice	Řádná víceúrovňová diagnostika: Vhodné krevní testy Zobrazovací metody
Stárnutí	
Narušený imunitní systém	
Toxické prostředí	
Hormonální dysbalance	Doporučení specialistů
Stres	Kontrola vystavení stresu
Kouření	Suplementace stopovými prvky
Chronický zánět	Vitaminy
Nezdravý životní styl	Personalizovaná výživa
Nevhodné dietní návyky	Přiměřená fyzická aktivita
Střevní mikroflora	Pre/probiotika
Abnormální BMI (vysoce individuální parametr)	Fyziologický BMI (vysoce individuální parametr)

### ***Klinický obraz***

PCa probíhá velmi dlouho bez klinických příznaků a většinou se zjistí náhodně při preventivním vyšetření (vyšetření per rectum a stanovení PSA). Klinické příznaky se objevují u pokročilejšího onemocnění a jedná se většinou o problémy při močení, které lze jen obtížně odlišit od příznaků souvisejících s BHP, dále o bolesti zad, hematurii nebo přítomnost krve ve spermatu. Hubnutí, bledost, celková slabost a otoky dolních končetin mohou být známkou již metastatického PCa [Čapoun et al., 2022; Hradil, 2014].

### ***Histologie***

Více než 95 % nádorů prostaty jsou adenokarcinomy. Vznikají buď z epitelálních buněk acinů (acinární karcinom, typicky se vyskytuje v periferní oblasti prostaty) nebo řidčeji v periuretrálních vývodech (duktální karcinom). Ostatní karcinomy prostaty jsou vzácné, např. mucinózní karcinom a velmi vzácný sarkomatoidní karcinom. Pro určení stupně histologické diference nádoru se používá Gleasonovo skóre (GS). Tento systém hodnotí

architektonické uspořádání buněk v nádorových ložiscích podle stupně diferenciace (G1–5). V této stupnici znamená G1 dobrá diferenciace a G5 velmi špatná diferenciace buněk. Protože se v karcinomu prostaty často vyskytují minimálně dva typy různě diferencovaných okrsků buněk, stupeň nejvíce zastoupeného typu se uvede jako první, druhý nejvíce zastoupený jako druhý. Hodnota GS se odvíjí od součtu těchto dvou stupňů diferenciace buněk. Výsledkem je hodnota 2–10, kde nad 8 je již vysoce riziková [Kurfürstová and Král, 2013]. V roce 2016 International Society of Urological Pathology (ISUP) revidovala grading systém u PCa (tabulka 5). Jedná se o doplňkové pokyny a revidovaný systém klasifikace PCa nazvaný Grade Groups. Tento systém je jednodušší, s pouhými pěti stupni, 1 až 5 [Epstein et al., 2016].

**Tabulka 5 – Revidovaný systém klasifikace PCa Grade Groups**  
[upraveno podle Epstein et al, 2016]

Gleason skóre	ISUP Grade group
6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8	4
9, 10	5

*Legenda: Grade group 1 (odpovídá GS 6) - je PCa nejnižšího možného stupně, který lze ve většině případů sledovat s aktivním dohledem (sledování je však stále potřeba, protože přibližně ve 20 % případů je v prostatě PCa vyššího stupně, z něhož nebyly odebrány vzorky). Grade group 2 (odpovídá GS 7 (3+4)) - PCa s velmi dobrou prognózou jen vzácně metastazující.*

*Grade group 3 (odpovídá GS 7 (4+3)) - PCa má výrazně horší prognózu než stupeň 2.*

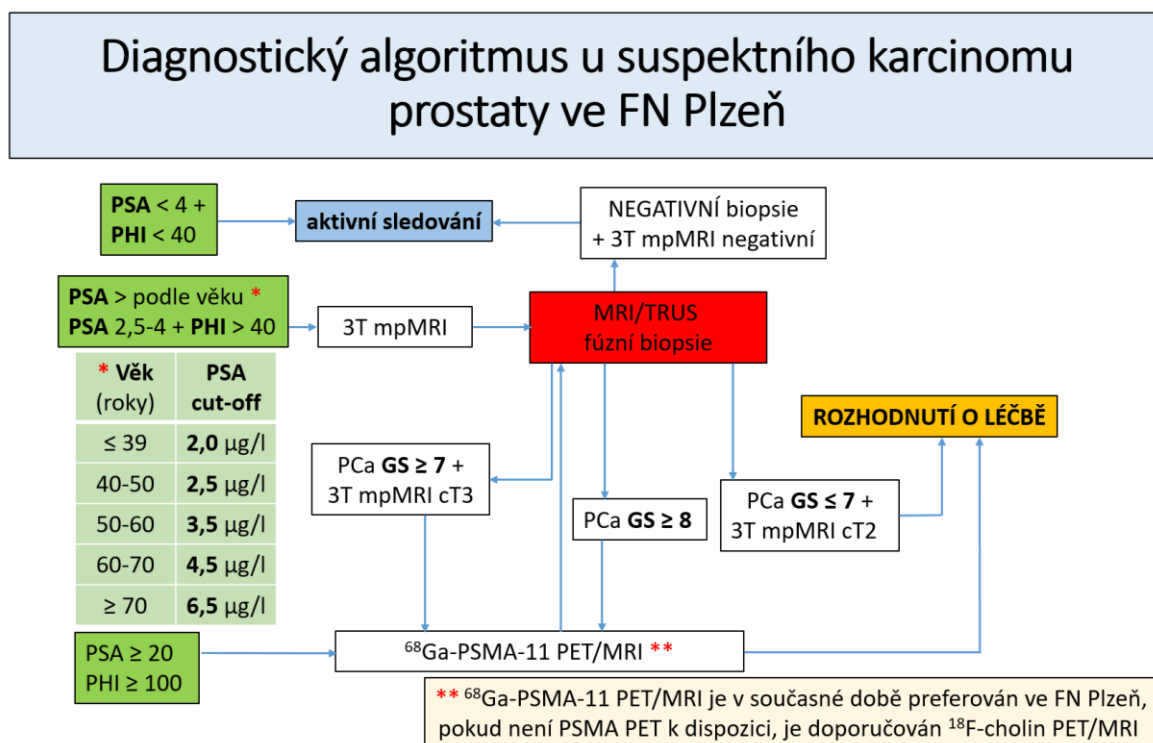
*Grade group 4 - PCa má výrazně lepší prognózu než stupeň 5.*

*Grade group 5 - odstraňuje potřebu rozlišovat mezi Gleasonovými skóre 4+5, 5+4 a 5+5.*

### **Diagnostika**

Stejně jako u jiných typů onkologického onemocnění může být PCa úspěšněji léčen, pokud je diagnostikován včas. Doporučuje se tzv. včasná detekce u mužů nad 50 let a u mužů nad 45 let, kteří mají výskyt PCa v rodinné anamnéze. Jedná se o vyšetření prostaty per rectum a o odběr krve na stanovení tPSA. Diagnostika karcinomu prostaty je v současnosti založena na třech pilířích: panel biomarkerů prostaty, zobrazovací techniky a histologická verifikace. Další postup shrnuje diagnostický algoritmus PCa navržený a používaný od roku 2021 ve FN Plzeň (obrázek 10). Tento algoritmus je každoročně doplňován o nové poznatky a nové diagnostické postupy zaváděné do klinické praxe. Je tak zajištěno, že algoritmus bude i nadále odrážet nejaktuálnější používané postupy. Jedná se o nástroj pro stratifikaci pacientů, staging a hodnocení agresivity PCa tak, aby byla zajištěna správná individualizace léčebného procesu. V první linii stratifikace pacientů je diagnostický algoritmus PCa vytvořen pomocí tPSA a zejména PHI. Poté se pokračuje v diagnostické cestě

prostřednictvím zobrazovacích technik a biopsie. Po zhodnocení dvou výše uvedených se přistupuje k samotnému rozhodnutí o léčbě [Sedláčková et al., 2021].



**Obrázek 10 – Algoritmus pro diagnostiku karcinomu prostaty**  
[Sedláčková et al., 2021]

*Legenda: PSA – Prostatický specifický antigen; PHI – Index zdraví prostaty; 3T mpMRI – multiparametrická magnetická rezonance; MRI/TRUS – spojení kontur obrazu magnetické rezonance s transrektálním ultrasonografickým obrazem v reálném čase; GS – Gleason skóre; PET/MR – metoda využívající dvou metod v rámci jednoho přístroje – magnetickou rezonanci (MR) a pozitronovou emisní tomografií (PET); <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 – radiofarmakum používané pro zobrazování PCa metodou PET.*

Prvním krokem je stratifikovat pacienty do tří skupin podle úrovně tPSA a PHI. Pokud jsou hladiny PSA a PHI nízké, pacienti jsou hodnoceni jako benigní: budou stále sledováni a znovu testováni, obvykle po šesti měsících (aktivní sledování). Pokud je hladina tPSA nad referenčním rozmezím pro věkovou skupinu pacienta a/nebo je hladina PHI vyšší než 40, druhým krokem je provedení zobrazovacích technik. K lokalizaci léze, ale i ke zhodnocení podrobnější anatomie před operací, se používá multiparametrická magnetická rezonance (mpMRI). Aby se dosáhlo co nejlepších výsledků při histologické verifikaci PCa, provádí se cílená biopsie prostaty (tzv. fúzní biopsie). Pomocí softwaru se spojí kontury obrazu magnetické rezonance s transrektálním ultrasonografickým (TRUS) obrazem v reálném čase, což dovoluje precizní odebrání vzorků z podezřelých ložisek v prostatě. Technologie fúze umožňuje kontrolovanou biopsii ve třech rovinách. Oproti běžným vyšetřením se tak zvyšuje možnost záchytu i velmi malých ložisek, a navíc

umožňuje dřívější záchyt karcinomu, který běžně není vidět. Pokud má pacient tPSA nad 20 a/nebo PHI nad 100, je v současnosti ve FN Plzeň preferováno provedení <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 PET/MRI. To se provádí v případech, kdy existuje silné podezření, že pacient má vysoké riziko rozvoje PCa nebo má lokálně pokročilý PCa. Na základě výsledků histologie hodnocených pomocí GS a ISUP Grade group a zobrazovacích vyšetření, je zvolen vhodný způsob léčby podle stadia onemocnění [Sedláčková et al., 2021].

Mikroskopické zpracování odebraných vzorků je tedy zásadní pro určení diagnózy karcinomu a stupně jeho agresivity. Bez histologického potvrzení diagnózy není možné zahájit případnou terapii [Mottet et al., 2021].

Pro popis klinického stadia PCa (pouze pro adenokarcinomy) se používá mezinárodní klasifikace TNM (obrázek 11) [Mottet et al., 2021].

### **Terapie**

Po zavedení vyšetření PSA do klinické praxe v 90. letech 20. století došlo ke strmému vzestupu případů PCa, který nadále pokračuje. Terapie PCa byla po dlouhou dobu zaujata dosti konzervativními názory, které lze stručně shrnout takto: PCa je život neohrožující onemocnění orgánově specifické etiologie (spíše než systémové), které je charakteristické pro seniory, a proto může být snadno detekováno screeningem PSA u stárnoucí mužské populace s následovnou radikální prostatektomií jako optimálním přístupem k léčbě PCa. V současnosti se odhaduje, že až polovina pacientů má tzv. nízkorizikový PCa (nesignifikantní, indolentní), jehož léčba přináší sice kompletní odstranění nádoru, ale také vysoké riziko závažných a dlouhodobých nežádoucích účinků (inkontinence, impotence, striktura spojky) a také nemalou ekonomickou zátěž pro společnost. Z toho důvodu se stále častěji uplatňují tzv. konzervativní postupy (aktivní sledování, pozorné vyčkávání), které mají za cíl pečlivé sledování pacienta a zahájení léčby až v případě aktivity onemocnění PCa [Čapoun et al., 2022].

- Aktivní sledování (active surveillance) – u mladých pacientů s nízkým rizikem; cílem je oddálit dobu radikální terapie s cílem zachovat kvalitu života.
- Pozorné vyčkávání (watchful waiting) – u pacientů, kteří jsou limitováni přidruženými chorobami nebo jsou pokročilého věku [Čapoun et al., 2022].
- Radikální léčba, mezi kterou se řadí:

*Radioterapie* – radikální (s nebo bez hormonální suprese) nebo brachyradioterapie

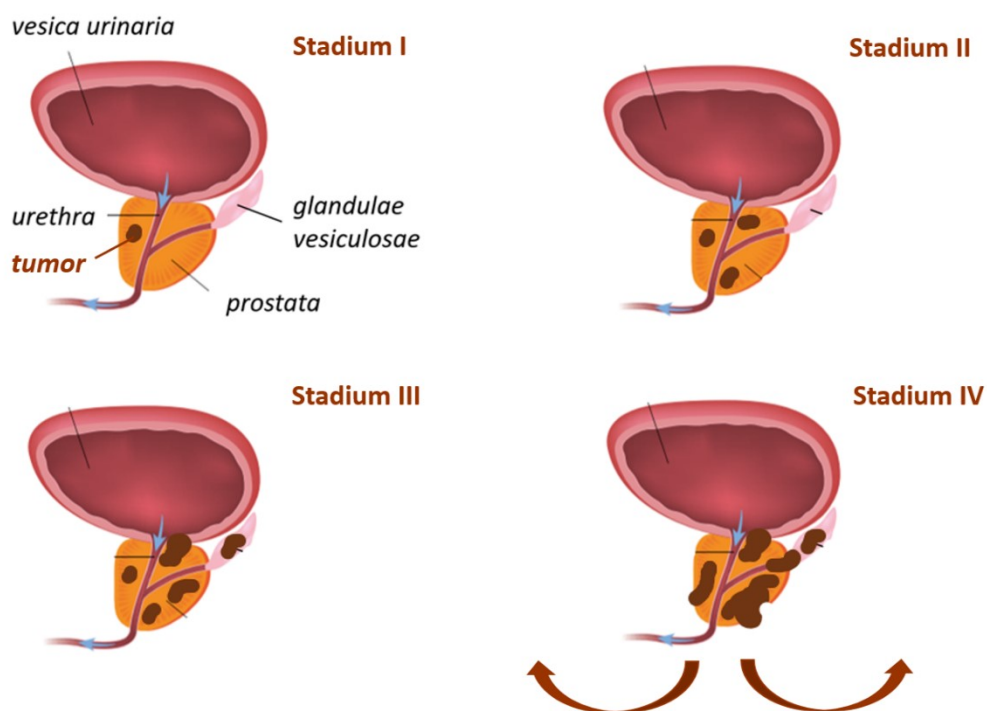
*Chirurgická léčba* – radikální prostatektomie s různým operativním přístupem (otevřená, laparoskopická, robotická), s lymfadenektomií, případně nervy šetřící operační postup

*Hormonální léčba* – u metastatického hormonálně senzitivního karcinomu prostaty

*Chemoterapie* – především u kastračně rezistentního PCa [Rušarová et al. 2019; Dvořák, 2014; Katolická, 2013; Grepl, 2010].



### Stadia karcinomu prostaty



**Obrázek 11 – Klinická stadia karcinomu prostaty**  
[upraveno podle <https://www.symptomy.cz/nemoc/rakovina-prostaty>]

*Legenda: Stadium I – nádor omezen na prostatu (T1), postihuje polovinu jednoho laloku nebo méně (T2a); Stadium II – nádor omezen na prostatu, může postihovat oba laloky (T2b, T2c); Stadium III – nádor se šíří přes pouzdro prostaty (T3), mikroskopické postižení hrdla močového měchýře (T3a), infiltrace semenných váčků (T3b); Stadium IV – nádor postihuje nejen semenné váčky, ale i další struktury (T4), metastázy v regionálních mízních uzlinách (N), vzdálené metastázy (M1).*

## **2 Praktická část**

### **2.1 Cíle práce:**

Tato práce si klade za cíl:

1. Zjistit optimální preanalytické podmínky Anti-Mülleriánského hormonu (AMH).
2. Posoudit vliv dodržování preanalytických podmínek na klinické využití AMH a posoudit rizika při jejich nedodržení.
3. Zjistit optimální preanalytické podmínky celkového prostatického specifického antigenu (tPSA), jeho volné frakce (fPSA) a prekursoru [-2]proPSA.
4. Posoudit vliv dodržování preanalytických podmínek na diagnostické využití tPSA, fPSA, [-2]proPSA, vypočítávaných parametrů poměru fPSA/tPSA a Indexu zdraví prostaty (PHI) a posoudit rizika při jejich nedodržení.

## 2.2 Materiál a metodika

### 2.2.1 AMH design studie

Cílem této studie bylo zjistit stabilitu AMH v biologickém materiálu přepravovaném či skladovaném pro diagnostické a vědecké účely ve dvou typech vzorků během různých preanalytických podmínek (opakované rozmrazování, různá teplota a doba skladování). Návrh studie byl připraven v souladu se standardními operačními postupy doporučovanými ISBER pro testování stability vzorků séra nebo plazmy (tabulka 6).

**Tabulka 6 - Protokol testování stability AMH u vzorků séra a plazmy**

Začátek skladování při	Číslo alikvotu	R/Z cyklus	Finální skladování při
-80 °C	1	0	-80 °C
	2	1	
	3	2	
	4	3	
	5	4	
	6	5	
Začátek skladování při	Číslo alikvotu	Doba skladování	Finální skladování při
RT 4 °C	7–12 13–18	1 h	-80 °C
		2 h	
		4 h	
		24 h	
		72 h	
		168 h	
-20 °C	19	30 d	-80 °C

*Legenda: RT (room temperature) – laboratorní teplota 22 °C; cyklus R/Z (rozmrazení/zmrazení) – cyklus rozmrazení 2 h při RT a následné skladování vzorku po dobu alespoň 12 hodin při -80 °C; h – počet hodin; d – počet dní.*

### 2.2.2 Skupina pacientů pro stanovení AMH

Soubor pro tuto studii tvořilo 26 dobrovolníků (2 muži a 24 žen), studentů medicíny, jejichž průměrný věk byl 22 let (21–23 let). Minimální počet účastníků byl vypočten pomocí power analýzy (podrobný popis v části 2.2.11). U žen byly vzorky odebírány nezávisle ke dni menstruačního cyklu. Žádný ze subjektů neuvedl, že by byl léčen nebo měl v anamnéze endokrinologické poruchy nebo poruchy plodnosti. Subjekty nebyly vyloučeny na základě užívání HC.

### 2.2.3 Odběry vzorků pro stanovení AMH

Periferní krev byla odebrána pomocí zkumavek VACUETTE® Z Serum Sep a VACUETTE® lithiových heparinových (LH) plazmových zkumavek (Greiner Bio-One,

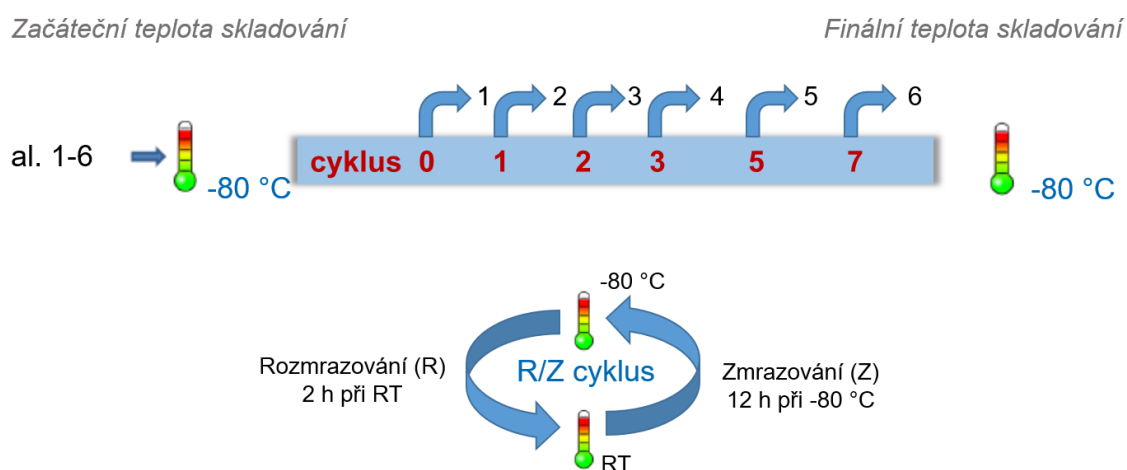
Kremsmünster, Rakousko). Od každého účastníka byly odebrány vzorky séra i plazmy pomocí vakuového systému s uzavřenými zkumavkami. Vzorky byly odstředěny a sérum nebo plazma byly odděleny do 1 hodiny od odběru krve. Rozmezí hodnot AMH u žen bylo mezi 2,10–8,91 ng/ml a u mužů 14,76–17,74 ng/ml.

#### 2.2.4 Zpracování vzorků

Vzorky byly zpracovány podle protokolu doporučeným ISBER – Standardní operační postup (SOP) pro testování stability vzorků. Všechny vzorky byly rozděleny do 19 alikvotů se stejným objemem 300 µl. Je důležité, aby každý alikvot obsahoval stejný objem vzorku, a aby byl použit stejný druh reakčních zkumavek, protože nestejně objemy vzorků mohou ovlivnit koncentraci biomarkeru v důsledku absorpce nebo odpařování [ISBER, 2015].

Jako první krok byla měřena hladina AMH v čerstvých (fresh) vzorcích před jejich zmrazením. Následující postup byl použit pro testování stability biomarkeru při opakovaném rozmrazování a zmrazování (obrázek 12). Prvních šest alikvotů bylo zmrazeno na -80 °C. Alikvot č. 1 byl po celou dobu udržován při -80 °C. Následně, po 12 hodinách, byly alikvoty č. 2–6 rozmrazeny po dobu dvou hodin při RT a poté byly znovu zmrazeny na -80 °C. Po následné 12hodinové periodě byly alikvoty č. 3–6 rozmrazeny a zmrazeny stejným způsobem a skladovány při -80 °C. Po dalších 12 hodinách byly alikvoty č. 4–6 rozmrazeny, znovu zmrazeny a skladovány při -80 °C. 12 hodin poté byly alikvoty č. 5–6 rozmrazeny a znovu zmrazeny, a nakonec pouze alikvot č. 6 byl rozmrazen a znovu zmrazen. Všechny alikvoty pak byly skladovány při -80 °C.

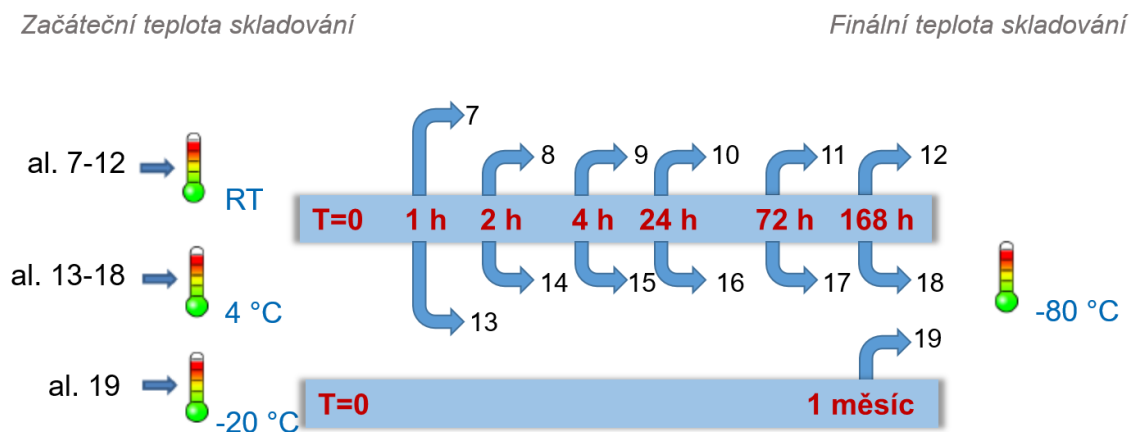
#### Stabilita při rozmrazování a zmrazování



**Obrázek 12 – Standardní operační postup pro testování stability vzorků opakovaným rozmrazováním a zmrazováním**  
[upraveno podle ISBER, 2015]

Současně probíhal test skladovací stability (obrázek 13). V čase  $t = 0$  h byly alikvoty č. 7–12 uloženy při RT 22 °C a dalších šest alikvotů, č. 13–18, bylo uloženo v lednici při 4 °C. V časových bodech  $t = 1$  h,  $t = 2$  h,  $t = 4$  h,  $t = 24$  h,  $t = 72$  h,  $t = 168$  h, byl jeden vzorek uložený při každé teplotě (RT a 4 °C) přenesen do -80 °C. Alikvot č. 19 byl skladován při -20 °C po dobu jednoho měsíce a poté byl umístěn do -80 °C. Nakonec byly všechny vzorky uloženy v mrazáku při -80 °C. Týden po uložení posledního vzorku na -80 °C byly všechny vzorky rozmrazeny a hladina AMH byla změřena ve všech vzorcích najednou pomocí chemiluminiscenčního testu Access AMH. Test je podrobněji popsán v kapitole 2.2.10.

### Stabilita skladování



**Obrázek 13 – Standardní operační postup pro testování stability vzorků během skladování při různých teplotách**  
[upraveno podle ISBER, 2015]

### 2.2.5 PSA design studie

Dalším cílem této práce bylo zjistit stabilitu prostatických markerů v biologickém materiálu připravovaném a skladovaném převážně pro diagnostické účely ve vzorcích séra během různých preanalytických podmínek (opakované rozmrazování, různá teplota a doba skladování). Návrh této studie byl připraven v souladu s SOP doporučenými ISBER pro testování stability vzorků séra (tabulka 7).

**Tabulka 7 - Protokol testování stability PSA markerů u vzorků séra**

Začátek skladování při	Číslo alikvotu	R/Z cyklus	Finální skladování při
-80 °C	2	1	-80 °C
	3	2	

Začátek skladování při	Číslo alikvotu	Doba skladování	Finální skladování při
RT	4–10	1 h	-80 °C
		2 h	
		4 h	
4 °C	11–17	6 h	
		8 h	
		24 h	
		72 h	

*Legenda: RT (room temperature) – laboratorní teplota 22 °C; cyklus R/Z (rozmrazení/zmrazení) – cyklus rozmrazení 2 h při RT a následné skladování vzorku po dobu 24 hodin při -80 °C; h – počet hodin; d – počet dní.*

### 2.2.6 Skupina pacientů pro stanovení PSA markerů

Tato studie byla provedena v období od 11/2022 do 04/2023 ve Fakultní nemocnici v Plzni. Zařazeno bylo 45 dobrovolníků, mužů ve věku 60–85 let (průměrný věk byl 67,8). 36 pacientů mělo v diagnóze BHP a jednalo se o odběry krve při pravidelné prohlídce u urologa. 9 dobrovolníků byly zdravé osoby, podstupující preventivní vyšetření. Kritériem pro zařazení do studie byla celková hodnota PSA 2–10 ng/ml, stanovená v souladu s EAU Guidelines on Prostate Cancer [EAU Guidelines, 2023]. Charakteristiky pacienta a výchozí hodnota prostatických markerů, které byly stanoveny v čerstvých vzorcích, jsou uvedeny v tabulce 8. Pacienti s PCa a polymorbidní pacienti byli z této studie vyloučeni. Vzhledem k předpokladu falešně pozitivních výsledků byly do studie zahrnuty pouze zdravé osoby a pacienti s BHP. Toto vedlo k možnosti sledovat a vyhodnotit falešně pozitivní posun ve výsledcích. Od všech subjektů zapojených do studie byl získán písemný informovaný souhlas. Studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy (číslo schválení 464/2022, vydáno 3. listopadu 2022).

**Tabulka 8 - Charakteristika pacientů a výchozí hodnota prostatických markerů (čerstvé vzorky)**

Proměnné	Hodnota
<b>Muži</b>	45
<b>Věk (roky)</b>	
median (min – max)	<b>71</b> (80–85)
<b>tPSA (ng/ml)</b>	
median (min – max)	<b>3.87</b> (2.0–9.25)
<b>fPSA (ng/ml)</b>	
median (min – max)	<b>1.11</b> (0.46–2.22)
<b>[-2]pro-PSA (pg/ml)</b>	
median (min – max)	<b>12.95</b> (6.55–28.23)
<b>fPSA/tPSA (-)</b>	
median (min – max)	<b>0.25</b> (0.17–0.44)
<b>PHI (-)</b>	
median (min – max)	<b>25.49</b> (9.98–39.51)
<b>Objem prostaty (cm<sup>3</sup>)</b>	
median (min – max)	<b>31.2</b> (16.1–78.6)
<b>Biopsie prostaty</b>	
Ano (benigní / maligní)	<b>36</b> (36/0)
Ne (předpokládaný zdravý)	<b>9</b>

### 2.2.7 Odběry vzorků pro stanovení PSA markerů

Periferní krev byla odebrána pomocí zkumavek VACUETTE® CAT Serum Clot Activator (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Rakousko). Vzorky byly centrifugovány při 1 700 otáčkách za minutu po dobu 10 minut a sérum odděleno do 1 hodiny od odběru krve. Každé sérum bylo poté rozděleno na 17 alikvotů po 300  $\mu$ l. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.4, je důležité, aby každý alikvot obsahoval stejný objem vzorku a aby byl použit stejný druh reakčních zkumavek. Nestejné objemy vzorků mohou ovlivnit koncentraci biomarkeru v důsledku absorpce nebo odpařování [ISBER, 2015].

### 2.2.8 Zpracování vzorků

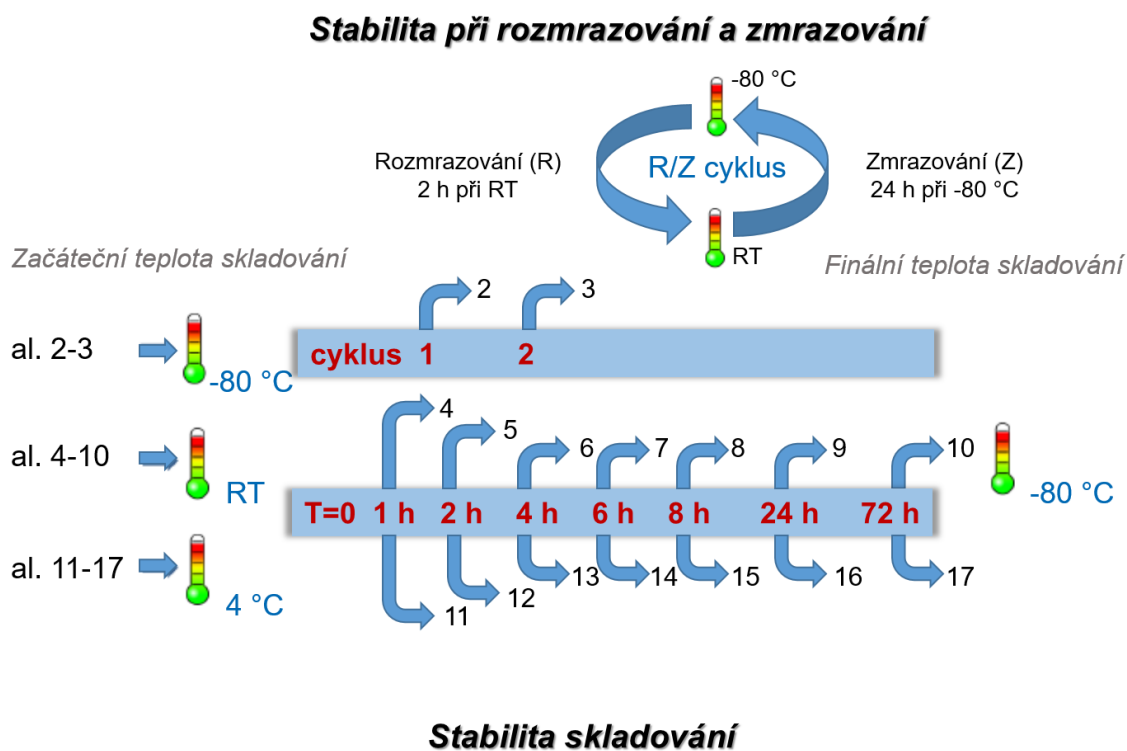
Vzorky byly podrobeny různým preanalytickým podmínkám podle upraveného protokolu ISBER.

Nejprve byla měřena hladina biomarkerů tPSA, fPSA a [-2]proPSA v čerstvých alikvotech č. 1 před jejich zmrazením. Koncentrace tPSA ve vzorcích čerstvého séra se pohybovaly v rozmezí 2,01–9,25 ng/ml, koncentrace fPSA ve vzorcích čerstvého séra byly mezi 0,46–2,22 ng/ml a pro [-2]proPSA byly změřeny koncentrace ve vzorcích čerstvého séra mezi 6,55–28,63 pg/ml. Z těchto hodnot se následně vypočítal poměr fPSA/tPSA (0,17–0,44) a PHI (9,98–39,51).

Alikvoty č. 2 a č. 3 byly použity pro testování stability při rozmrazování a zmrazování. Oba alikvoty byly vloženy do mrazáku a udržovány po dobu 24 hodin při -80 °C. Po 24 hodinách

byly alikvoty č. 2 a č. 3 rozmrazeny po dobu dvou hodin při RT a poté znovu zmrazeny při -80 °C. Po 48 hodinách se alikvot č. 3 rozmrazil po dobu dvou hodin při RT a poté se znovu zmrazil při -80 °C. Metodika testování stability při rozmrazování a zmrazování je zobrazena na obrázku 14.

Stabilita skladování byla testována při RT a při 4 °C. V čase t = 0 h byly alikvoty č. 4–10 uloženy při RT a dalších sedm alikvotů (č. 11–17) bylo uloženo v lednici při 4 °C. V časových bodech t = 1 h, t = 2 h, t = 4 h, t = 6 h, t = 8 h, t = 24 h a t = 72 h, byl jeden alikvot uložený při každé teplotě (RT a 4 °C) přenesen do -80 °C. Nakonec byly všechny alikvoty uloženy v mrazáku při -80 °C (obrázek 14). Týden po uložení poslední alikvoty na -80 °C byly všechny vzorky rozmrazeny a hladina tPSA, fPSA a [-2]proPSA změřena ve všech vzorcích najednou pomocí chemiluminiscenčních testu Access PSA, fPSA a [-2]proPSA. Test je podrobněji popsán v kapitole 2.2.10.



**Obrázek 14 – Standardní operační postup pro testování stability vzorků během skladování při různých teplotách**  
[upraveno podle ISBER, 2015]



## 2.2.9 Analýza vzorků

### AMH

Hladiny AMH byly měřeny pomocí chemiluminiscenčního testu Access AMH (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) s limitem detekce (LOD)  $\leq 0,02$  ng/ml a limitem kvantifikace (LOQ)  $\leq 0,08$  ng/ml pro kvantitativní stanovení hladiny AMH v lidském séru a plazmě. Test je simultánní jednokrokový sendvičový imunotest využívající pár myších monoklonálních protilátek rozpoznávajících celkový AMH [Groome et al., 2011]. Jako záchytná protilátka byla použita F2B/12H potahující paramagnetické částice a jako detekční protilátka byla použita F2B/7A konjugovaná s alkalickou fosfatázou [Demirdjian et al., 2016]. Všechna měření byla provedena pomocí systému UniCel® DxI 800 Immunoassay System (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) (obrázek 15).

### Prostatické markery

Všechny analýzy byly provedeny pomocí chemiluminiscenčních souprav ACCESS (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), a to Access Hybritech PSA (analytická citlivost  $< 0,008$  ng/ml, celková nepřesnost  $\leq 7$  %); Access Hybritech free PSA (analytická citlivost  $< 0,005$  ng/ml, celková nepřesnost  $\leq 7$  %); Access Hybritech [-2]proPSA (analytická citlivost  $< 0,5$  pg/ml, celková nepřesnost  $\leq 10$  %). Pro všechna měření byl použit Immunoassay System UniCel® DxI 800 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) (obrázek 15). Měření byla provedena v souladu s pokyny výrobce [Beckman Coulter, 2022; Beckman Coulter, 2020].

Index zdraví prostaty byl vypočítán pomocí následujícího vzorce:

$$PHI = \left( \frac{[-2]proPSA}{fPSA} \right) \times \sqrt{tPSA}$$



**Obrázek 15 – Příklad na chemiluminiscenční imunoanalýzu - UniCel DxI 800 Access  
Immunoassay System**  
[foceno Oddělení imunochemické diagnostiky FN Plzeň, 2023]

### 2.2.10 Princip použité imunoanalytické metody

Pro analýzu všech vzorků byla použita metoda chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA). Obecně jde o analytickou metodu, která kombinuje chemiluminiscenční techniku s imunochemickou reakcí. Výhody této metody jsou vysoká citlivost, široký rozsah linearity detekce, dobrá specifita, široká škála aplikací a nízká koncentrace analytu [Šafarčík et al., 2018].

Luminiscence je samovolné vyzařování fotonů luminoforem (pevná nebo kapalná látka). Chemiluminiscenční metody využívají jako luminofory různé látky, které jsou k produkci světelného záření iniciovány na základě průběhu chemické reakce. Produkce světla chemickou reakcí je časově omezena a je proto nezbytné, aby měření proběhlo v určitém definovaném okamžiku. Mezi luminiscenční látky patří např. luminol, izoluminol, lucigenin, sulfonamidy nebo estery akridinových barviv. K měření luminiscence se používají přístroje nazvané luminometry, které měří pouze světlo produkované luminoforem. Luminiscence umožňuje detekci látek v koncentraci do  $10^{-18}$  mol/l [Bartoš et al., 2013].

Při chemiluminiscenční imunoanalýze se dále využívají protilátky reagující s daným antigenem, které jsou speciálně označené. Využívají se tři různé systémy značení podle mechanismu emise světla: chemická látka přímo zapojená do reakce světelné emise (např. akridiumester), enzymově katalyzovaná světelná emisní reakce (využití enzymů ke značení protilátky např. peroxidáza a alkalická fosfatáza (ALP)) a redoxní reakce zprostředkovaná světelnou emisní reakcí (např. ruthenium tris-bipyridin) [Bartoš et al., 2013].

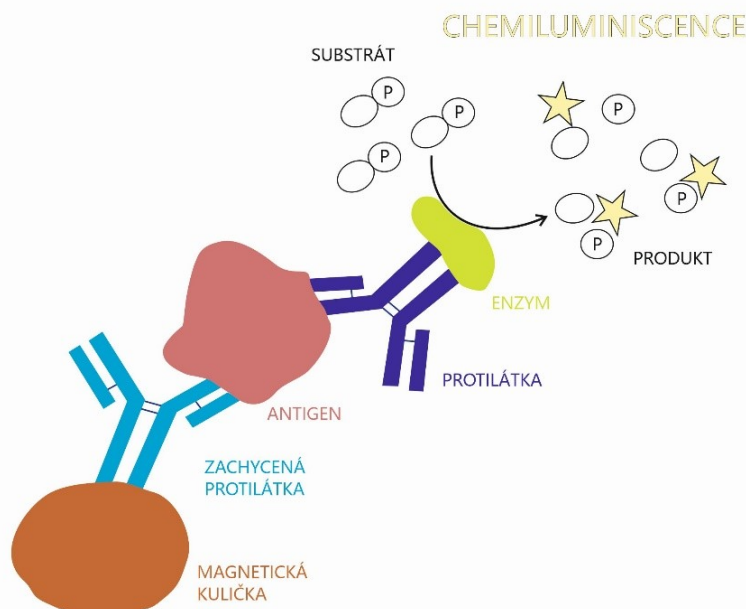
Výhody CLIA lze zvýšit použitím magnetických kuliček jako pevné platformy, která zlepšuje separaci nenavázaných činidel [Šafarčík et al., 2018].

#### Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA)

Test Access AMH je simultánní jedнокrokový imunoenzymatický „sendvičový“ test. Dochází k reakci mezi dvěma monoklonálními protilátkami a dvěma epitopy (oblasti antigenu, na kterou se váží protilátky) analytu (antigenu). Jedna protilátka je vázána na magnetických částicích, druhá na sobě nese ALP. Po inkubaci v reakční nádobě jsou materiály navázané na pevnou fázi drženy v magnetickém poli, zatímco nenavázané materiály jsou vymyty. Poté se k reakci přidá chemiluminiscenční substrát. Při enzymatickém štěpení fosfátové skupiny chemiluminiscenčního substrátu se tato sloučenina destabilizuje a rozkládá, při čemž dojde k emisi světla. Po proběhnutí reakce s ALP se provede luminometrické měření světla generované touto reakcí luminometrem (obrázek 16). Světlo, které tato reakce vytvoří, je přímo úměrné koncentraci AMH ve vzorku. Množství analytu ve vzorku se stanoví z uložené vícebodové kalibrační křivky [Pearson et al., 2016].

Test Access Hybritech PSA je dvoumístný imunoenzymatický "sendvičový" test. Princip stanovení je stejný jako výše popsané stanovení AMH. Použité protilátky jsou myší proti PSA, jedna protilátka je vázána na magnetických částicích, druhá na sobě nese ALP. Jako chemiluminiscenční substrát se používá Lumi-Phos\*\* 530 a světlo generované reakcí se měří luminometrem (obrázek 16). Produkce světla je úměrná koncentraci PSA ve vzorku. Množství analytu ve vzorku se stanoví z uložené vícebodové kalibrační křivky [Vignati and Giovanelli, 2007].

Stejným se způsobem se postupuje při stanovení fPSA a [-2]proPSA.



**Obrázek 16 – Princip chemiluminiscenční imunoanalýzy**

[upraveno podle <https://postudium.cz/mod/book/tool/print/index.php?id=5374>]

### 2.2.11 Statistická analýza získaných dat

#### AMH

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Všechny grafy byly konstruovány pomocí SW STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Nejprve byla provedena analýza velikosti vzorku. Minimální počet účastníků požadovaný pro významnost byl vypočítán jako 21 (pouze ženy) na základě testu ekvivalence s limitem tolerance +/- 0,30 ng/mL a testovací silou 90%.

Pro měřené parametry byl vypočten průměr, střední hodnota, směrodatná odchylka (SD), rozptyl, mezikvartilní rozmezí, minimum a maximum.

K posouzení ekvivalence AMH mezi počáteční a testovanou hodnotou byl použit test ekvivalence (párový design) s použitím dvou jednostranných testů. P-hodnota menší než 0,05 byla považována za statisticky významnou. Rozdíl hodnot AMH v séru a plazmě v čase  $t = 0$  byl testován pomocí Wilcoxon Two-Sample Test. Progrese parametrů v čase byla testována pomocí Friedman ANOVA. Změny ve zkoumaných parametrech v čase a mezi skupinami byly testovány pomocí Parametric Repeated ANOVA a také klasickou analýzou rozptylu (opakovaný design).

## PSA

Všechny statistické testy a grafické analýzy byly provedeny pomocí programu MATLAB, V. R2007b (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA). Data obsahují odlehle hodnoty, které by zkreslovaly střední hodnoty a směrodatné odchylky. K eliminaci těchto jevů byly zvoleny neparametrické testy. Data jsou popsána pomocí střední hodnoty, 10% kvantilu a 90% kvantilu. Tyto kvantily byly použity (místo běžnějších 5% a 95%) z důvodu nízkého počtu pacientů ve zkoumaném souboru.

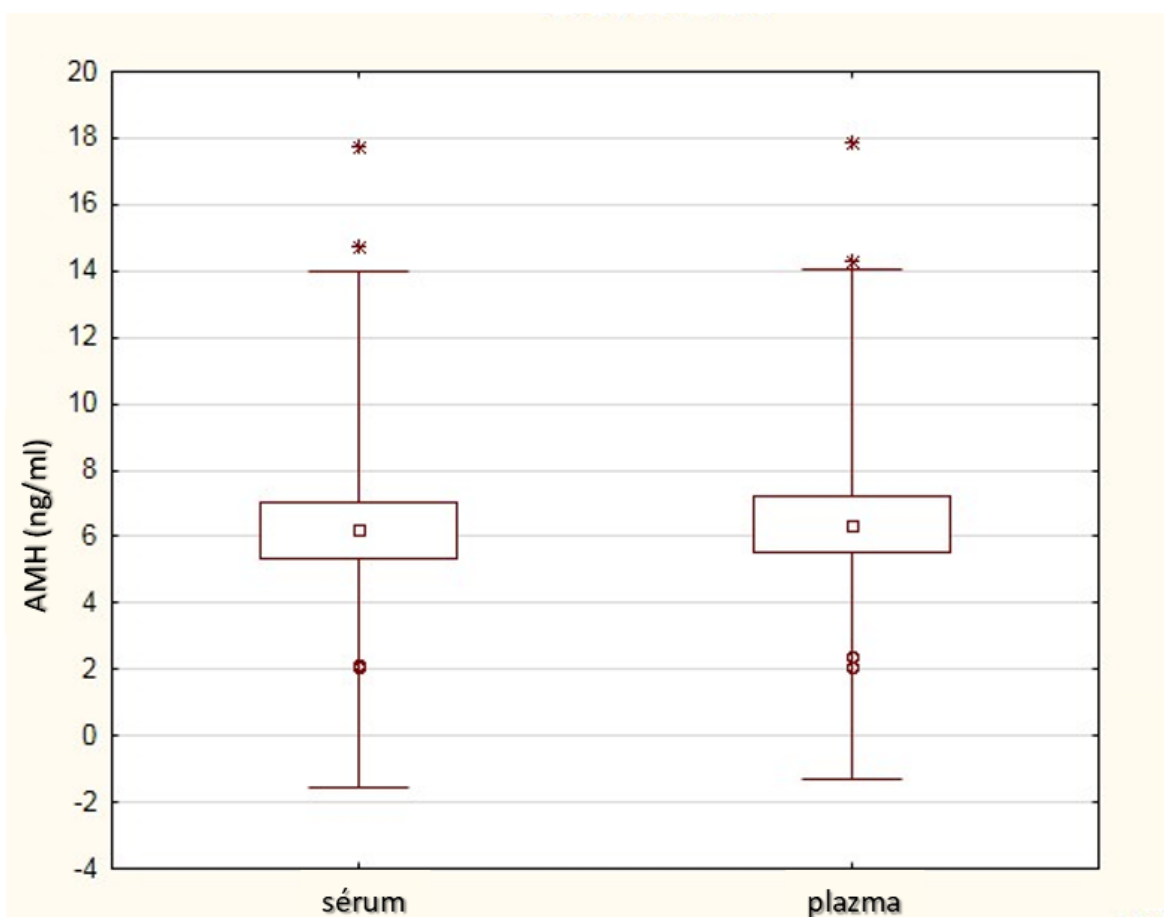
Za účelem optimálního grafického zobrazení a lepší porovnatelnosti stability mezi jednotlivými biomarkery v čase byly vypočteny relativní hodnoty nastavením hodnoty 100 % v čase  $t = 0$ . Následné hodnoty byly vyjádřeny také v procentech. Rozdíl mezi hodnotami v čase  $t = 0$  a  $t = T$  byl testován s využitím hodnot biomarkerů (nikoli procent). Hodnoty v čase  $t = T$  byly testovány na rozdíl proti hodnotám v čase  $t = 0$  pomocí Kruskal-Wallis test (neparametrická verze klasického t-testu).

### 3 Souhrn výsledků a jejich diskuze

#### 3.1 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 1

##### *Zjištění optimálních preanalytických podmínek Anti-Mülleriánského hormonu (AMH)*

Hladiny AMH se u mužů a žen liší [Jopling et al., 2018]. Ve věku 22 let vykazují muži významně vyšší hodnoty AMH než ženy [Anderson and Su, 2020], což se odrazilo i v této studii. Vzorky odebrané od mužských subjektů vykazovaly významně vyšší hladiny (obrázek 17). Avšak vzhledem k tomu, že je práce zaměřena především na roli AMH v IVF, byly po předběžné statistické analýze mužské vzorky vyloučeny.



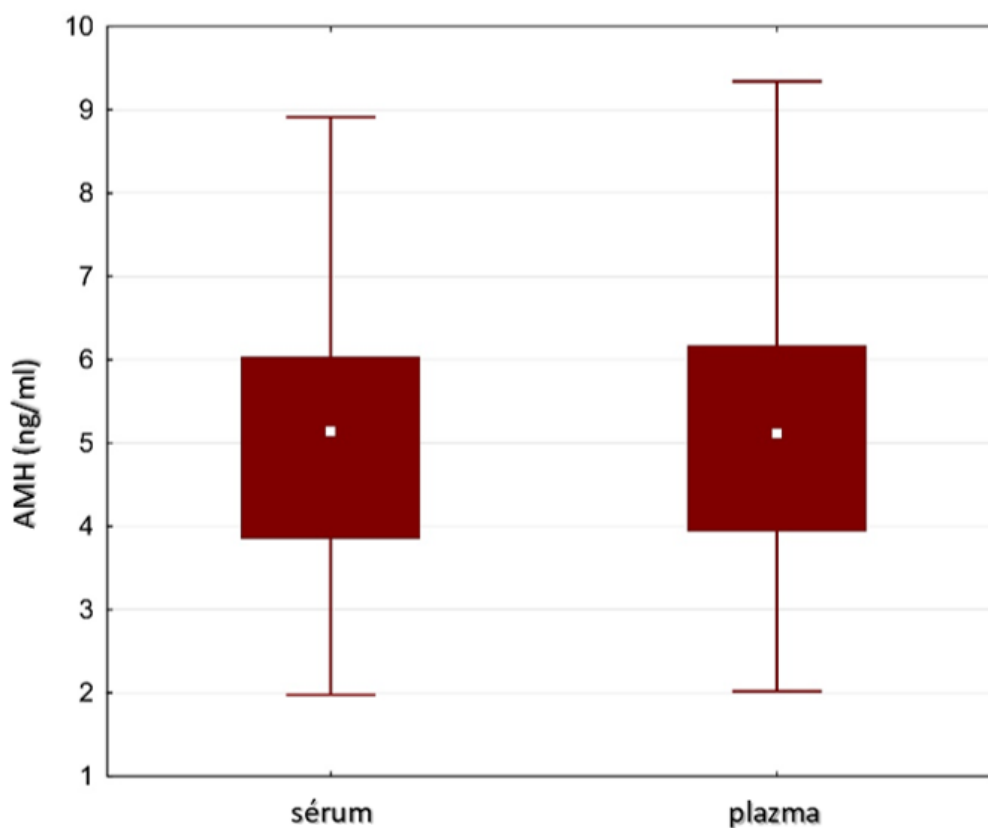
**Obrázek 17 – Rozdíl v distribuci počátečních hodnot AMH v séru a v plazmě ve vzorcích žen a mužů**

*Legenda: boxy představují  $\pm$  směrodatnou odchylku z průměru hodnot koncentrací AMH v séru a v plazmě v čase  $t = 0$  u fresh vzorků (čerstvých alikvotech před zmrazením); bílé čtverečky uprostřed – průměr hodnot; ° - odlehlé hodnoty; \* - extrémně odlehlé hodnoty.*

Zobrazené teoretické záporné hodnoty jsou způsobeny tím, že takto dohromady (muži + ženy) je průměr bližší k ženám (více pacientek), nicméně rozptyl je ovlivněn muži, kteří mají výrazně vyšší hodnoty (a protože jich je ve studii málo,  $n = 2$ , jsou tato pozorování označena za odlehle hodnoty). V realitě se totiž zřejmě nejedná o jedno Gaussovské rozdělení, ale jedná se o dvě Gaussovy křivky (jedna pro ženy, druhá pro muže).

Po vyloučení mužských vzorků bylo dále testováno pouze 24 vzorků ženských.

Nejprve byl stanoven rozdíl v distribuci počátečních hodnot (v čase  $t = 0$ ) AMH v séru a v plazmě za použití testu o rozdílu - Wilcoxon Two Sample test. Byl prokázán statisticky nevýznamný rozdíl mezi oběma soubory ( $p = 0,8858$ ) (obrázek 18). Soubory vzorků plazmy a séra jsou tedy mezi sebou srovnatelné.



**Obrázek 18 – Rozdíl v distribuci počátečních hodnot AMH v séru a v plazmě**

*Legenda: boxy představují dolní a horní kvartil středních hodnot koncentrací AMH v séru a v plazmě žen v čase  $t = 0$  u fresh vzorků; bílé čtverečky uprostřed – střední hodnota; svislé úsečky označují rozsah hodnot.*

### **Cykly rozmrazování a zmrazování**

Dalším krokem bylo stanovit stabilitu AMH během rozmrazování a zmrazování. Aby bylo možno říci, zda došlo k poklesu či vzestupu koncentrace analytu a o kolik, byl použit Wilcoxon Two-Sample Test. Párové proměnné byly definovány takto:

**změna = hodnota ve vzorcích po pátém cyklu rozmrazení - hodnota ve fresh vzorcích** (v čerstvých alikvotech před zmrazením)

Výsledky testování stability AMH rozmrazováním a zmrazováním ve vzorcích séra a plazmy jsou shrnuty v tabulce 9.

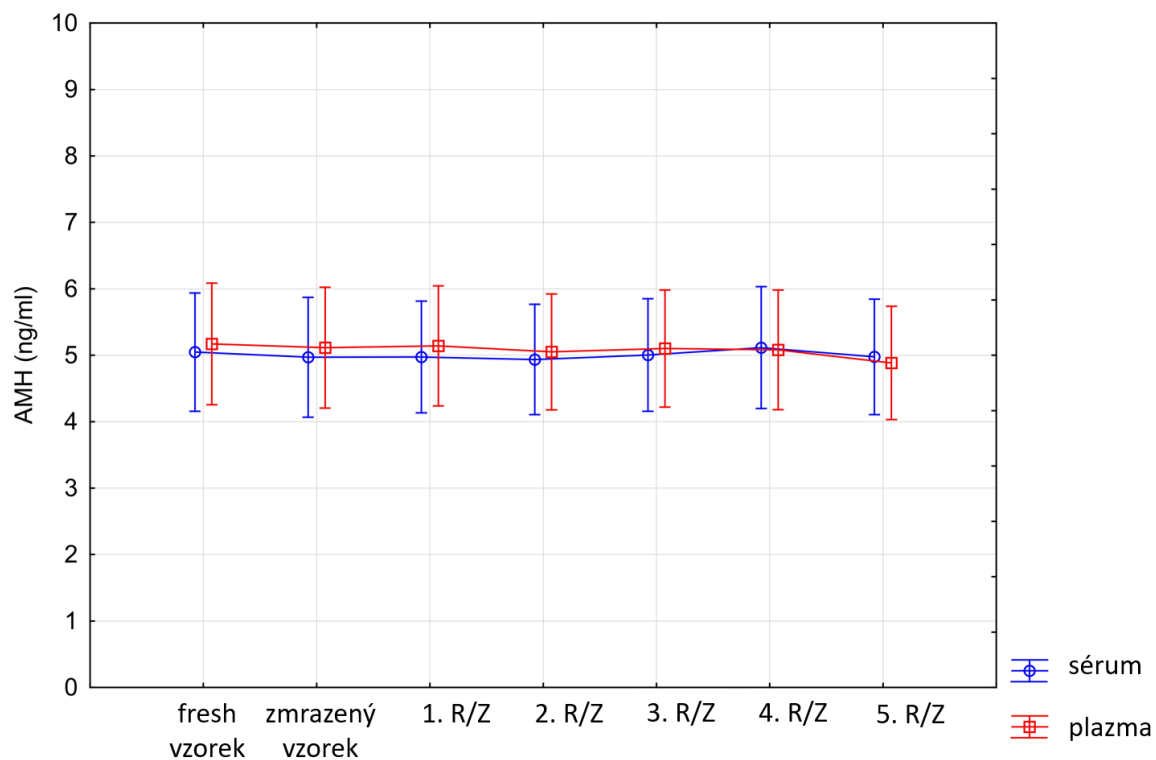
Vzorky séra nevykazovaly žádnou změnu ve stabilitě AMH během rozmrazování a zmrazování ( $p = 0,5883$ ), zatímco hodnoty AMH ve vzorcích plazmy časem klesaly. Zde byl prokázán pokles koncentrace AMH po pátém cyklu rozmrazení oproti fresh vzorku o 2,15 % (ve střední hodnotě). Podařilo se prokázat statisticky významný rozdíl ( $p < 0,0001$ ). Graficky vyjádřeno na obrázku 19.

**Tabulka 9 - Sumární statistiky výsledků testování stability AMH rozmrazováním a zmrazováním ve vzorcích séra a plazmy**

<b>Podmínky skladování AMH</b>	<b>Průměr [ng/ml]</b>	<b>Střední hodnota [ng/ml]</b>	<b>Dolní kvartil [ng/ml]</b>	<b>Horní kvartil [ng/ml]</b>
<b>Sérum</b>				
Fresh vzorek	5,048	5,140	3,855	6,030
Zmrazený vzorek	4,971	5,025	3,805	5,950
R/Z cyklus 1	4,975	5,260	3,860	5,825
R/Z cyklus 2	4,936	5,100	3,920	6,060
R/Z cyklus 3	5,005	5,170	3,870	6,045
R/Z cyklus 4	5,114	5,560	3,750	6,035
R/Z cyklus 5	4,976	4,985	3,825	5,865
<b>Plazma</b>				
Fresh vzorek	5,170	5,120	3,940	6,170
Zmrazený vzorek	5,115	5,110	3,895	6,030
R/Z cyklus 1	5,142	5,290	3,845	6,185
R/Z cyklus 2	5,051	5,020	3,890	5,985
R/Z cyklus 3	5,102	5,220	3,925	6,110
R/Z cyklus 4	5,082	5,255	3,870	6,255
R/Z cyklus 5	4,885	5,010	3,740	5,845

*Legenda: cyklus R/Z (rozmrazení/zmrazení) – cyklus rozmrazení 2 h při RT a následné skladování vzorku po dobu alespoň 12 hodin při -80 °C.*





**Obrázek 19 – Stabilita AMH během rozmrazování a zmrazování ve vzorcích séra a plazmy**

*Legenda: graf vyjadřuje průměr hodnot koncentrací AMH u žen ve vzorcích séra a v plazmy stanovených po každém cyklu rozmrazení/zmrazení (R/Z). Svislé úsečky označují intervaly spolehlivosti 0,95 (modré pro vzorky séra, červené pro vzorky plazmy).*

### **Skladování při 4 °C a 22 °C**

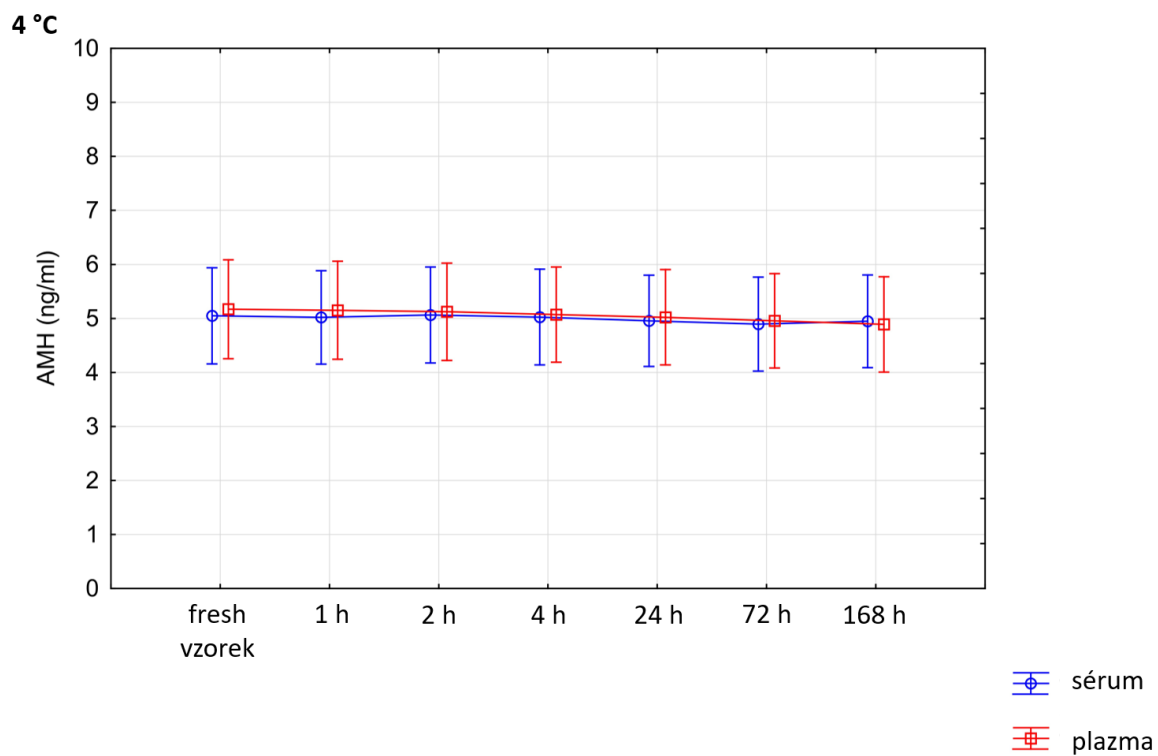
Dalším krokem bylo stanovit stabilitu AMH ve vzorcích séra a plazmy během skladování při 4 °C a 22 °C. Aby bylo možno říci, zda došlo k poklesu či vzestupu koncentrace analytu a o kolik, byl použit Wilcoxon Two-Sample Test. Párové proměnné byly definovány takto:

**změna = hodnota ve vzorcích po 168 h - hodnota ve fresh vzorcích** (v čerstvých alikvotech před zmrazením)

Stabilita AMH měřená ve vzorcích séra skladovaných při 4 °C zůstala nezměněna, zatímco hladina AMH ve vzorcích plazmy skladovaných při stejné teplotě v průběhu času postupně klesala (obrázek 20). Zde byl prokázán pokles koncentrace AMH ve vzorku skladovaném 168 hodin oproti fresh vzorku o 6,93 % (ve střenění hodnotě). Výsledky testování stability AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 4 °C jsou shrnuty v tabulce 10. Wilcoxon Two-Sample Test vyšel bez průkazu statisticky významného rozdílu změny v čase ( $p = 0,4502$ ) u vzorků séra. U vzorků plazmy Wilcoxon Two-Sample Test prokázal statisticky významný rozdíl ( $p < 0,001$ ).

**Tabulka 10 - Sumární statistiky výsledků testování stability AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 4 °C**

<b>Podmínky skladování AMH</b>	<b>Průměr [ng/ml]</b>	<b>Střední hodnota [ng/ml]</b>	<b>Dolní kvartil [ng/ml]</b>	<b>Horní kvartil [ng/ml]</b>
<b>Sérum</b>				
<b>Fresh vzorek</b>	5,048	5,140	3,855	6,030
Čas skladování při 4 °C				
1 h	5,019	5,155	3,765	5,950
2 h	5,063	5,205	3,875	6,095
4 h	5,025	5,145	3,900	6,035
24 h	4,957	5,155	3,885	5,820
72 h	4,895	4,895	3,860	5,950
168 h	4,948	5,045	3,805	5,980
<b>Plazma</b>				
<b>Fresh vzorek</b>	5,170	5,120	3,940	6,170
Čas skladování při 4 °C				
1 h	5,152	5,175	3,945	6,325
2 h	5,124	5,085	3,915	6,075
4 h	5,071	5,230	3,900	6,115
24 h	5,023	4,985	3,840	6,075
72 h	4,956	5,010	3,815	5,965
168 h	4,889	4,765	3,715	6,015



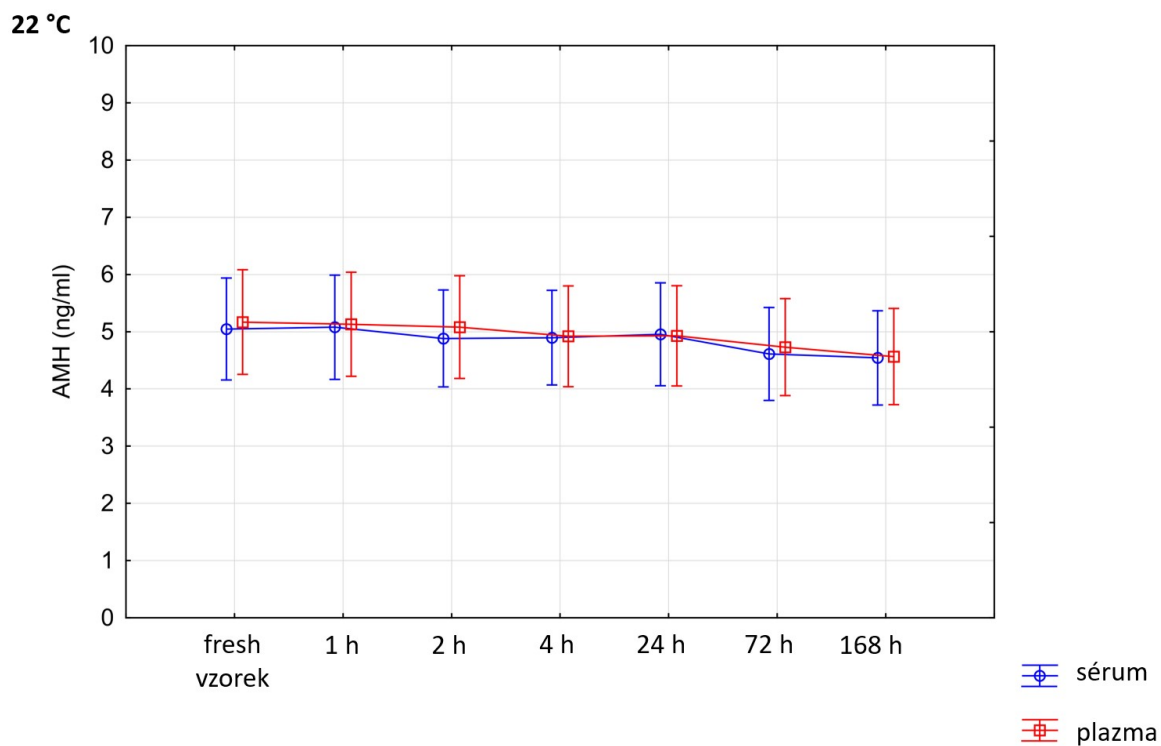
**Obrázek 20 – Stabilita AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 4 °C**

*Legenda: graf vyjadřuje průměr hodnot koncentrací AMH u žen ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 4 °C. Svislé úsečky označují intervaly spolehlivosti 0,95 (modré pro vzorky séra, červené pro vzorky plazmy).*

Stabilita AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při laboratorní teplotě 22 °C se u obou typů vzorků v průběhu času snižovala (obrázek 21). Zde byl prokázán pokles koncentrace AMH ve vzorku skladovaném 168 hodin oproti fresh vzorku o 13,38 % u séra a 14,84 % (obojí ve střední hodnotě) u plazmy. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 11. Wilcoxon Two-Sample Test prokázal statisticky významný rozdíl u vzorků séra i plazmy ( $p < 0,001$ ).

**Tabulka 11 - Sumární statistiky výsledků testování stability AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 22 °C**

<b>Podmínky skladování AMH</b>	<b>Průměr [ng/ml]</b>	<b>Střední hodnota [ng/ml]</b>	<b>Dolní kvartil [ng/ml]</b>	<b>Horní kvartil [ng/ml]</b>
<b>Sérum</b>				
<b>Fresh vzorek</b>	5,048	5,140	3,855	6,030
Čas skladování při 22 °C				
1 h	5,079	5,170	3,820	6,275
2 h	4,884	5,005	3,915	5,985
4 h	4,896	5,105	3,935	5,965
24 h	4,955	5,015	3,745	5,745
72 h	4,613	4,755	3,460	5,625
168 h	4,544	4,455	3,445	5,350
<b>Plazma</b>				
<b>Fresh vzorek</b>	5,170	5,120	3,940	6,170
Čas skladování při 22 °C				
1 h	5,131	5,135	3,945	6,105
2 h	5,081	5,190	3,935	6,050
4 h	4,921	4,860	3,745	5,850
24 h	4,927	4,980	3,745	5,920
72 h	4,731	4,560	3,670	5,745
168 h	4,565	4,360	3,330	5,740



**Obrázek 21 – Stabilita AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 22 °C**

*Legenda: graf vyjadřuje průměr hodnot koncentrací AMH u žen ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 22 °C. Svislé úsečky označují intervaly spolehlivosti 0,95 (modré pro vzorky séra, červené pro vzorky plazmy).*

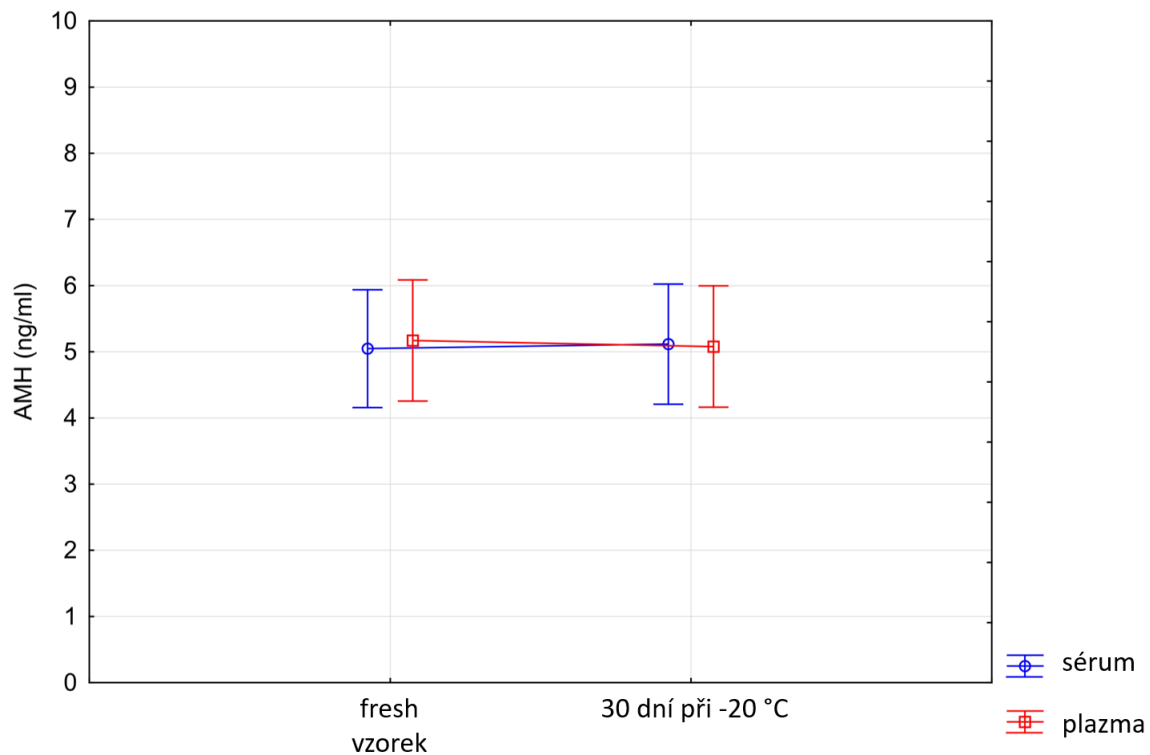
Pro stanovení stability AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných po dobu 30 dnů při -20 °C byly párové proměnné definovány takto:

**změna = hodnota ve vzorcích po 30 d - hodnota ve fresh vzorcích** (v čerstvých alikvotech před zmrazením)

Stabilita AMH měřená ve vzorcích séra a plazmy skladovaných po dobu 30 dnů při -20 °C se významně nezměnila. Výsledky testování jsou shrnuty v tabulce 12. Ani jeden typ vzorku nevykazoval změnu koncentrace AMH v čase (sérum:  $p = 0,6584$ ; plazma:  $p = 0,0599$ ) (obrázek 22).

**Tabulka 12 - Sumární statistiky výsledků testování stability AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných po dobu 30 dnů při -20 °C**

<b>Podmínky skladování AMH</b>	<b>Průměr [ng/ml]</b>	<b>Střední hodnota [ng/ml]</b>	<b>Dolní kvartil [ng/ml]</b>	<b>Horní kvartil [ng/ml]</b>
<b>Sérum</b>				
<b>Fresh vzorek</b>	5,048	5,140	3,855	6,030
30 dní skladování při - 20 °C	5,117	5,220	3,975	6,310
<b>Plazma</b>				
<b>Fresh vzorek</b>	5,170	5,120	3,940	6,170
30 dní skladování při - 20 °C	5,079	4,945	3,850	6,360



**Obrázek 22 – Stabilita AMH měřená ve vzorcích séra a plazmy skladovaných po dobu 30 dnů při -20 °C**

*Legenda: graf vyjadřuje průměr hodnot koncentrací AMH u žen ve vzorcích séra a plazmy skladovaných po dobu 30 dnů při -20 °C. Svislé úsečky označují intervaly spolehlivosti 0,95 (modré pro vzorky séra, červené pro vzorky plazmy).*

## Diskuze

AMH může cirkulovat v krvi v různých izoformách. Syntetizuje se jako preproprotein, který se po prvním štěpení přemění na proprotein pro-AMH. Druhým štěpením vzniká nekovalentní amino- a karboxy-terminální dimer (AMHN, AMHC) [Pankhurst and McLennan, 2013]. Bylo zjištěno, že v krvi mužů i žen se nachází za fyziologických podmínek významné množství jak pro-AMH, tak také AMHN a AMHC. AMHC je část dimeru aktivující receptor AMHR2 [Wissing et al., 2019]. Tato studie byla provedena pomocí komerčního testu s definovanými vazebnými charakteristikami dvojice použitých protilátek [Demirdjian et al., 2016]. Výsledky studií proto musí být vždy posouzeny s ohledem na charakteristiky protilátek použitých v testu.

V kapitole 1.7.6. je zmíněna role AMH v etiopatogenezi a diagnostice PCOS. Pacientky s tímto syndromem vykazují zvýšenou přítomnost aktivní izoformy AMHN v krvi. Tato izoforma tedy může být podle některých autorů zodpovědná za anovulaci spojenou s PCOS. Na porušeném poměru aktivních/neaktivních izoform AMH se podílejí metabolické změny: zvýšený BMI, zvýšená hladina C-peptidu, zvýšená hladina cholesterolu, triacylglycerolu a lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) atd. [Wissing et al., 2019]. Všechny výše zmíněné nálezy ovlivňují hladinu AMH v biologickém materiálu, proto ženy s touto diagnózou nebyly zavzaty do studie.

Zatímco bylo obecně předpokládáno, že se AMH uvolňuje do krevního řečiště určitou konstantní rychlostí během menstruačního cyklu, s minimální intraindividuální variabilitou [La Marca et al., 2013], nedávné publikace uvádějí kolísání hladin AMH během menstruačního cyklu [Melado et al., 2018; Gorkem et al., 2017; Overbeek et al., 2012]. Takové výkyvy mohou způsobit různé klinické problémy při hodnocení ovariální rezervy nebo podávání gonadotropinu. Tato studie je zaměřena na stanovení stability AMH uvolňovaného do krevního řečiště v době odběru vzorku, a proto metodika studie není těmito skutečnostmi ovlivněna. Naopak, protože biomarker je variabilnější, než se předpokládalo, lze stabilitu biomarkeru v preanalytických podmínkách vnímat jako dobrou zprávu pro klinické lékaře.

Hladiny AMH se mohou u žen v důsledku podávání HC snížit [Bernardi et al., 2021; Hariton et al., 2021; Landersoe et al., 2020]. Jelikož se tato studie zaměřuje na koncentraci AMH v krvi v době odběru vzorku, nepředstavuje ani tento pokles hladin AMH významný problém.

Tato studie byla zaměřena na stabilitu AMH po separaci krve. Pro vyloučení vlivu buněčné složky (možné proteolytické změny), bylo sérum a plazma separováno již jednu hodinu po odběru vzorků. Stabilita AMH ve vzorcích plné krve již byla popsána v literatuře. Fleming et al. uvádí významné zvýšení hladin AMH ve vzorcích plné krve, které byly skladovány v laboratoři (20 h, 44 h a 90 h) při pokojové teplotě (20 °C), stejně jako mírné zvýšení hladin AMH ve vzorcích plné krve uchovávané po dobu 90 hodin v lednici (4 °C). Je zřejmé, že příčinou nárůstu AMH je skutečnost, že nedošlo k separaci krve. To umožnilo proteolytickým enzymům obsaženým v buněčných složkách plné krve štěpit molekulu AMH, aniž by AMH klesalo. Následkem bylo paradoxní zvýšení koncentrací AMH. Naproti tomu v separovaných vzorcích krve zůstala hladina AMH stabilní i při delším skladování (5 dnů při 20 °C a poté 2 dny při 4 °C) [Fleming et al., 2013].



Stabilita cirkulujících biomarkerů může být ovlivněna opakovaným rozmrazováním a zmrazováním [Lee et al., 2015]. Prvním bodem, kterým se zabývá protokol stability ISBER, je účinek opakovaného rozmrazování a zmrazování na plazmatické a sérové koncentrace daného analytu. V této studii výsledky ukazují relativně vysokou stabilitu AMH při opakovaném rozmrazování a zmrazování pro všechny vzorky séra. Snížení hladiny AMH bylo prokázáno ve vzorcích plazmy po každém cyklu (tabulka 9, obrázek 19).

Znalost vlivu teploty a doby skladování na daný vzorek je součástí správné laboratorní praxe, proto je druhá polovina protokolu stability ISBER zaměřena na délku doby skladování a různé teplotní podmínky [Pawlik-Sobecka et al., 2020]. Vzorky byly skladovány při různých teplotách a po různě dlouhou dobu. Při testování stability skladování při 4 °C hodnoty ve vzorcích plazmy v průběhu času klesaly, ale ve vzorcích séra nikoli (tabulka 10, obrázek 20). Jako nejméně vhodná pro skladování či případný transport vzorků před provedením analýzy se ukázala laboratorní teplota 22 °C: statisticky významný pokles AMH byl prokázán ve vzorcích séra i plazmy poté, co byly skladovány právě při laboratorní teplotě 22 °C (tabulka 11, obrázek 21).

Krátkodobé skladování (30 dní) vzorků při -20 °C ukázalo, že si molekula AMH zachovala vysokou stabilitu ve vzorcích séra i plazmy (tabulka 12, obrázek 22).

### 3.2 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 2

#### *Posouzení vlivu dodržování preanalytických podmínek na klinické využití AMH a posouzení rizik při jejich nedodržení*

Preanalytická fáze je důležitou součástí vysoce kvalitního výstupu v každé laboratoři. V posledních letech je věnována značná pozornost vlivu preanalytických podmínek na laboratorní výsledky [Narayanan, 2000]. Každý den se získávají miliony klinických vzorků pro použití v diagnostických testech, které podporují klinické rozhodování. Kvalita vzorků musí být standardizována jako základní podmínka, která zajistí přesné výsledky v odebraných vzorcích [Marko-Varga et al., 2012]. Pouze vhodné biomarkery měřené ve vzorcích adekvátní kvality mohou zlepšit diagnostický proces a klinický management pacientů [Campbell et al., 2018].

Tato studie prokázala pokles koncentrace AMH ve vzorcích v průběhu času při absenci vhodných preanalytických podmínek, a to při:

- delším stání vzorků séra i plazmy při laboratorní teplotě (22 °C)
- při delším stání vzorků plazmy v lednici (4 °C)
- během opakovaného rozmrazování vzorků plazmy.

Díky těmto podmínkám byly naměřeny nízké koncentrace AMH na rozdíl od koncentrací měřených ve fresh vzorcích. Tyto nízké hladiny tedy neodpovídají skutečnosti a jsou falešně negativní.

Také Kumar et al. testovali stabilitu AMH v alikvotech 10 vzorků séra a 10 vzorků LH plazmy během různých podmínek skladování a třech cyklů opakovaného rozmrazení a zmrazení po dobu 7 dnů. Ukázali, že AMH si udržuje stabilitu ve vzorcích séra lépe než ve vzorcích plazmy za různých podmínek skladování [Kumar et al., 2010].

V této studii se klade důraz na testování za specifických podmínek podle SOP doporučených ISBER pro testování stability vzorku [ISBER, 2015]. Tyto standardní operační postupy velmi efektivně kombinují testy pro různé podmínky, které s největší pravděpodobností nastanou během přepravy vzorku.

Pro metodiku stanovení AMH je již od roku 2019 připraven WHO standard, jeho implementace do praxe však velmi vážne, což omezuje srovnání mezi jednotlivými testy pro stanovení AMH [WHO, 2019]. Také je málo známo o endogenních a exogenních faktorech, které ovlivňují hladiny AMH v séru/plazmě [Moolhuijsen and Visser, 2020]. Kromě výše uvedeného WHO standardu také tato problematika omezuje správnou interpretaci hodnot AMH v klinickém prostředí.

Stanovení AMH se používá hlavně za účelem posouzení funkční ovariální rezervy, protože hladiny AMH odrážejí zásobu rostoucích folikulů, které mohou potenciálně ovulovat, viz kapitola 1.7.6. AMH je tedy v současné době významným markerem, který pomáhá lékařům určovat dávku gonadotropinů při ovariální stimulaci v rámci IVF. Dávka gonadotropinů nepřímo koreluje s naměřenou hodnotou AMH. Při falešně negativních

hladinách AMH může dojít k tomu, že na jejich základě stanovená dávka gonadotropinů bude pro danou ženu příliš vysoká, což může vést k nadměrné stimulaci ovaria, ke zrání příliš velkého počtu folikulů a v krajním případě až k vyvolání OHSS [Papaleo et al., 2016]. Z výše uvedeného důvodu vyplývá důležitost studie stability AMH [Vrzáková et al., 2023].

### 3.3 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 3

#### *Zjištění optimálních preanalytických podmínek celkového prostatického specifického antigenu (tPSA), jeho volné frakce (fPSA) a prekursoru [-2]proPSA*

Nejprve byla stanovena stabilita tPSA, fPSA a [-2]proPSA v čerstvých alikvotech, dále po jednom a druhém cyklu přemražení na -80 °C. Následoval test stability při skladování při 4 °C (v lednici) a při 22 °C (při pokojové, laboratorní teplotě, RT). Výsledky měření koncentrací těchto markerů v séru vyjádřené jako průměr a střední hodnota jsou shrnuty v tabulkách 13 a 14.

**Tabulka 13 - Sumární statistiky výsledků testování stability tPSA a fPSA**

<b>Podmínky skladování tPSA</b>	<b>Průměr [ng/ml]</b>	<b>Střední hodnota [ng/ml]</b>	<b>Podmínky skladování fPSA</b>	<b>Průměr [ng/ml]</b>	<b>Střední hodnota [ng/ml]</b>
<b>Fresh vzorek</b>	3,092	2,720	<b>Fresh vzorek</b>	0,470	0,360
R/Z cyklus 1	3,040	2,680	R/Z cyklus 1	0,450	0,330
R/Z cyklus 2	3,032	2,660	R/Z cyklus 2	0,444	0,340
<b>Čas skladování při 4 °C</b>			<b>Čas skladování při 4 °C</b>		
1 h	3,041	2,630	1 h	0,454	0,340
2 h	3,048	2,700	2 h	0,448	0,340
4 h	3,031	2,640	4 h	0,449	0,340
6 h	3,034	2,660	6 h	0,446	0,320
8 h	3,045	2,660	8 h	0,444	0,330
24 h	3,044	2,640	24 h	0,430	0,330
72 h	3,026	2,670	72 h	0,404	0,290
<b>Čas skladování při 22 °C</b>			<b>Čas skladování při 22 °C</b>		
1 h	3,050	2,670	1 h	0,445	0,340
2 h	3,049	2,670	2 h	0,454	0,350
4 h	3,036	2,670	4 h	0,439	0,330
6 h	3,045	2,670	6 h	0,447	0,330
8 h	3,038	2,660	8 h	0,439	0,330
24 h	3,008	2,650	24 h	0,427	0,320
72 h	2,963	2,640	72 h	0,407	0,300

*Legenda: cyklus R/Z (rozmrazení/zmrazení) – rozmrazení 2 h při RT a následné zmrazení vzorku po dobu alespoň 24 hodin při -80 °C; h – počet hodin.*

**Tabulka 14 - Sumární statistiky výsledků testování stability [-2]proPSA**

<b>Podmínky skladování [-2]proPSA</b>	<b>Průměr [ng/ml]</b>	<b>Střední hodnota [ng/ml]</b>
<b>Fresh vzorek</b>	7,446	6,550
R/Z cyklus 1	7,481	6,650
R/Z cyklus 2	7,519	6,150
Čas skladování při 4 °C		
1 h	7,430	6,570
2 h	7,393	6,380
4 h	7,433	6,400
6 h	7,316	6,100
8 h	7,436	6,180
24 h	7,515	6,960
72 h	7,737	6,830
Čas skladování při 22 °C		
1 h	7,306	6,060
2 h	7,444	6,740
4 h	7,357	6,450
6 h	7,295	6,460
8 h	7,569	6,460
24 h	8,238	6,920
72 h	13,636	9,280

*Legenda: cyklus R/Z (rozmrazení/zmrazení) – rozmrazení 2 h při RT a následné zmrazení vzorku po dobu alespoň 24 hodin při -80 °C; h – počet hodin.*

Z uvedených výsledků byly vypočteny relativní hodnoty nastavením hodnoty v čase  $t = 0$  jako 100 %, také následné hodnoty byly vyjádřené v procentech, tzv. procenta recovery (tabulka 15 a 16).

### **Cykly rozmrazování a zmrazování**

Výsledky testování rozmrazováním a zmrazováním jsou shrnuty v tabulce 15. Hodnoty čerstvých vzorků jsou uvedeny v prvním řádku, za nimi následují hodnoty procenta recovery po 1. a 2. cyklu rozmrazování a zmrazování. Profily měření jednotlivých markerů u každého pacienta jsou uvedeny na obrázku 23.

Hodnota tPSA byla asi o 0,8 % a 1,3 % (ve střední hodnotě) nižší než hodnoty zjištěné v čerstvých vzorcích pro 1. a 2. cyklus rozmrazení/zmrazení (obrázek 23 a). Protože se systematicky jedná asi o 3/4 vzorků, tyto výsledky jsou statisticky významné. Pokles tPSA asi o 1 % však není významný klinicky.

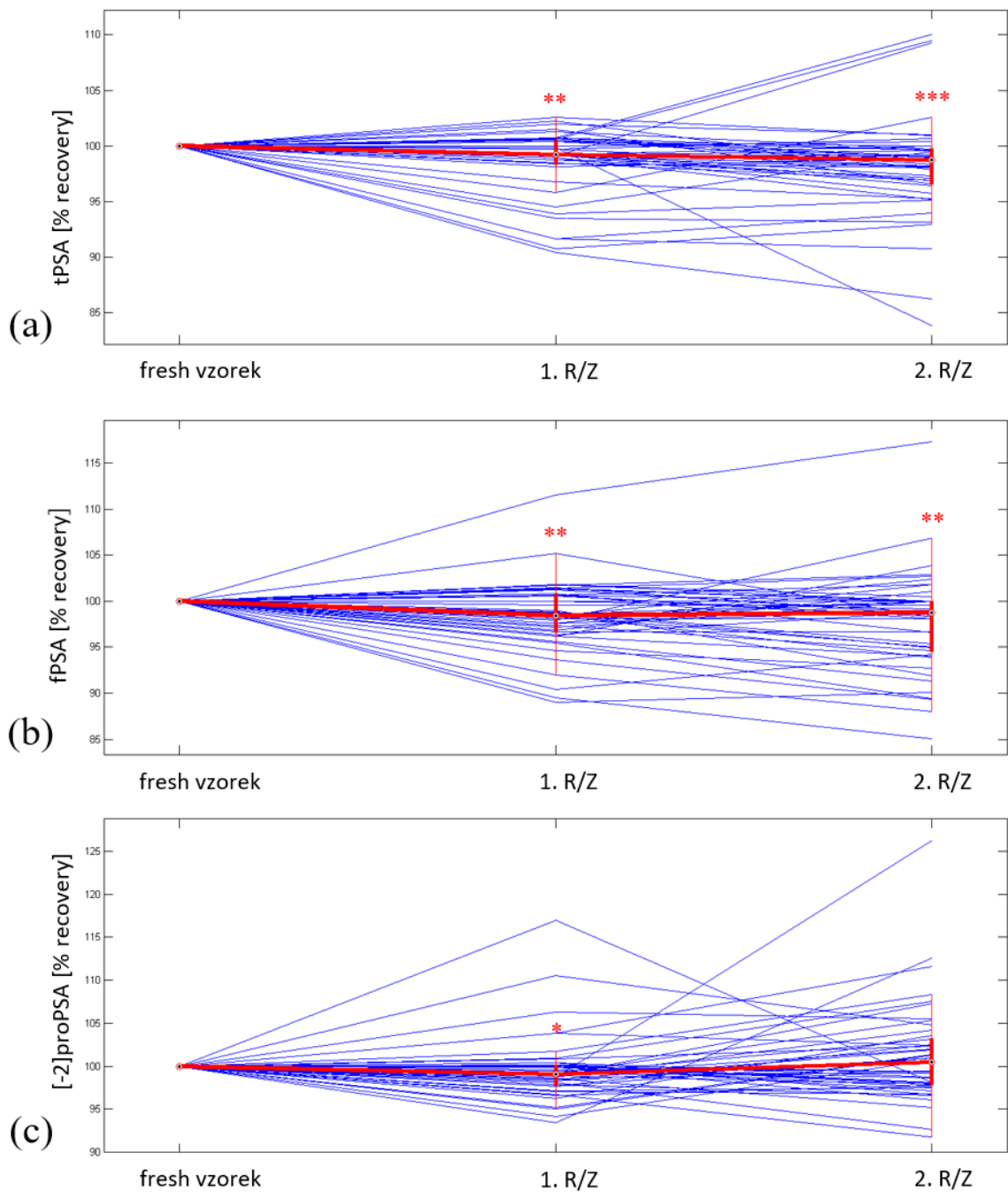
Hodnota fPSA byla asi o 1,5 % a 1,2 % (ve střední hodnotě) nižší než hodnoty zjištěné v čerstvých vzorcích pro 1. a 2. cyklus rozmrazení/zmrazení (obrázek 23 b). Stejně jako v případě tPSA se systematicky jedná asi o 3/4 vzorků, jde tedy o výsledky statisticky významné. Pokles fPSA o 1,5 % však není klinicky významný.

Hodnota [-2]proPSA po 1. cyklu rozmrazení/zmrazení byla asi o 0,9 % (ve střední hodnotě) nižší než jeho hodnota v čerstvých vzorcích (obrázek 23 c). Protože se to týká 67 % vzorků, je toto zjištění statisticky významné. Pokles [-2]proPSA o 0,9 % však není klinicky významný.

**Tabulka 15 - Sumární statistiky výsledků testování stability tPSA, fPSA a [-2]proPSA rozmrazováním a zmrazováním**

<b>R/Z cyklus</b>	<b>tPSA</b>	<b>fPSA</b>	<b>[-2]proPSA</b>
<b>0 (fresh)</b>	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)
<b>1</b>	99,2** (93,5–101,3)	98,5** (93,6–101,7)	99,1* (96,2–103,8)
<b>2</b>	98,7*** (93,1–101,0)	98,8** (90,1–102,7)	100,5 (96,7–107,6)

*Legenda: hodnoty představují procento recovery naměřených biomarkerů po 1. a 2. cyklu rozmrazení/zmrazení; všechny hodnoty jsou uvedeny jako střední hodnoty s 10% – 90% kvantily uvedenými v závorkách; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; cyklus R/Z (rozmrazení/zmrazení) – rozmrazení 2 h při RT a následné zmrazení vzorku po dobu alespoň 24 hodin při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .*



**Obrázek 23 - Stabilita tPSA, fPSA a [-2]proPSA ve vzorcích séra během rozmrazování a zmrazování**

*Legenda: modrá linka – jeden pacient; černá tečka – střední hodnota; červená čára – spojnice středních hodnot; červený rámeček – mezikvartilové rozmezí (25 % – 50 %); slabá červená čára – rozsah dat, pokud nepřesahuje 1,5násobek mezikvartilového rozmezí; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; R/Z – cyklus rozmrazení/zmrazení.*

### ***Skladování při 4 °C a 22 °C***

Výsledky testování stability tPSA, fPSA a [-2]proPSA v nastavených časových bodech při 4 °C a 22 °C jsou shrnuty v tabulce 16. Profily měření jednotlivých markerů u každého pacienta jsou uvedeny na obrázku 24 a 25.

Postupný pokles tPSA v procentech recovery byl pozorován téměř v každém časovém bodě, jak při 4 °C, tak při 22 °C (obrázek 24 a, 25 a). Většina z těchto poklesů byla statisticky významná. Nejnižší hodnota byla naměřena po 72 hodinách při teplotě místnosti a je o 3,1 % (ve střední hodnotě) nižší než hodnota naměřená v čerstvých vzorcích. Pokles tPSA o 3,1 % však není klinicky významný.

Byl zaznamenán také postupný pokles v procentech recovery fPSA (obrázek 24 b, 25 b). Většina z těchto poklesů byla statisticky významná. Nejnižší naměřená hodnota byla v bodě 72 h při 22 °C, a to o 10,8 % (ve střední hodnotě) nižší než hodnota naměřená u čerstvých vzorků. Tento pokles fPSA lze považovat za klinicky významný.

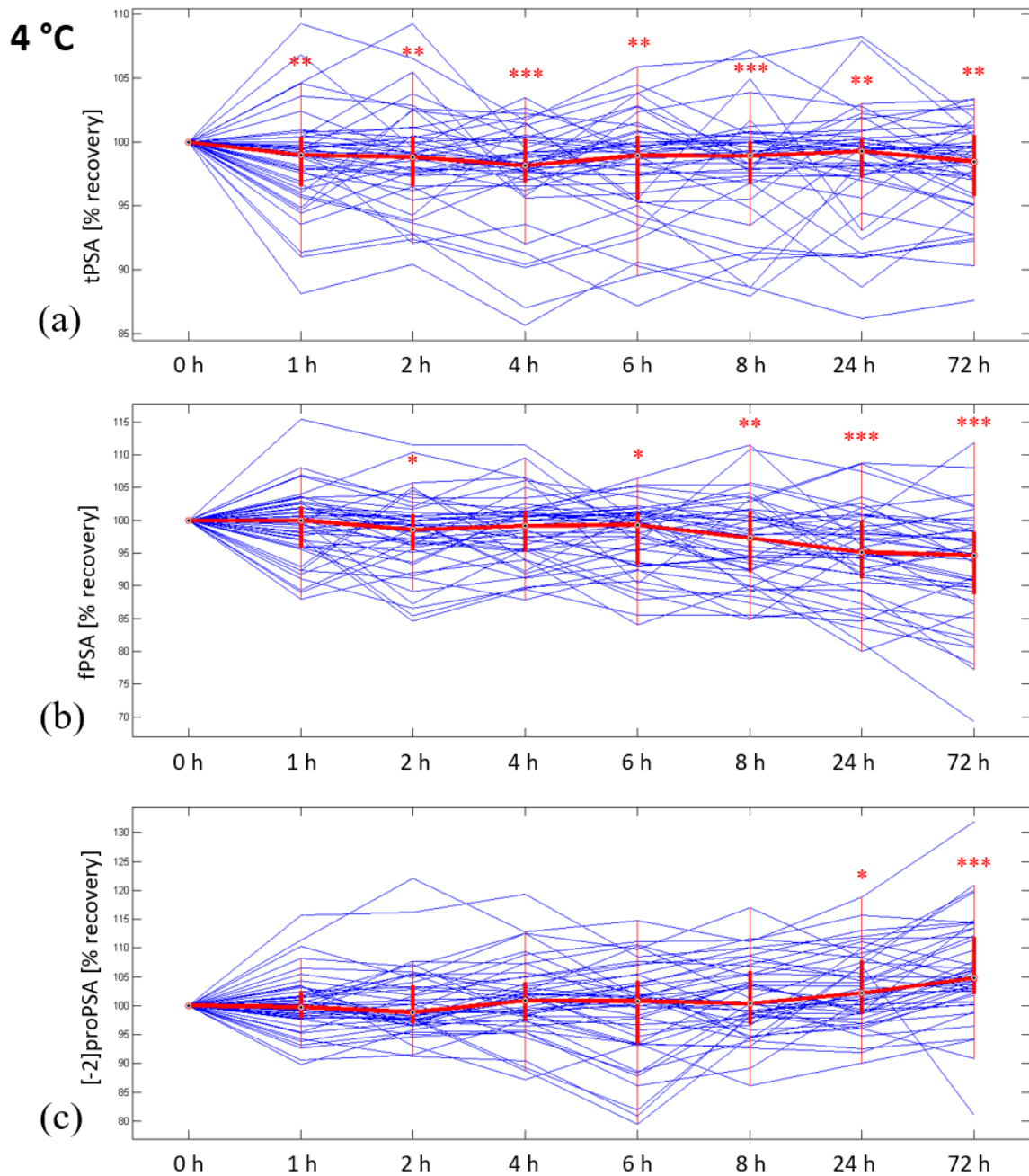
Na rozdíl od ostatních biomarkerů byl pozorován postupný nárůst procenta recovery [-2]proPSA. [-2]proPSA byl stabilní až do bodu 8 hodin, pokud byl udržován při 4 °C. Po 8 hodinách docházelo k postupnému nárůstu procent recovery (obrázek 24 c). Podobný trend byl také pozorován u [-2]proPSA při 22 °C se zvýšením začínajícím již v bodě 8 hodin. V dalších časových bodech (24 h, 72 h) docházelo k postupnému nárůstu procent recovery [-2]proPSA. Po 72 h při 22 °C byla hodnota o 30,5 % (ve střední hodnotě) vyšší než hodnota zjištěná u čerstvých vzorků (obrázek 25 c). Tento rozdíl je vysoce statisticky a klinicky významný.



**Tabulka 16 - Sumární statistiky výsledků testování stability tPSA, fPSA a [-2]proPSA při skladování při 4 °C a 22 °C**

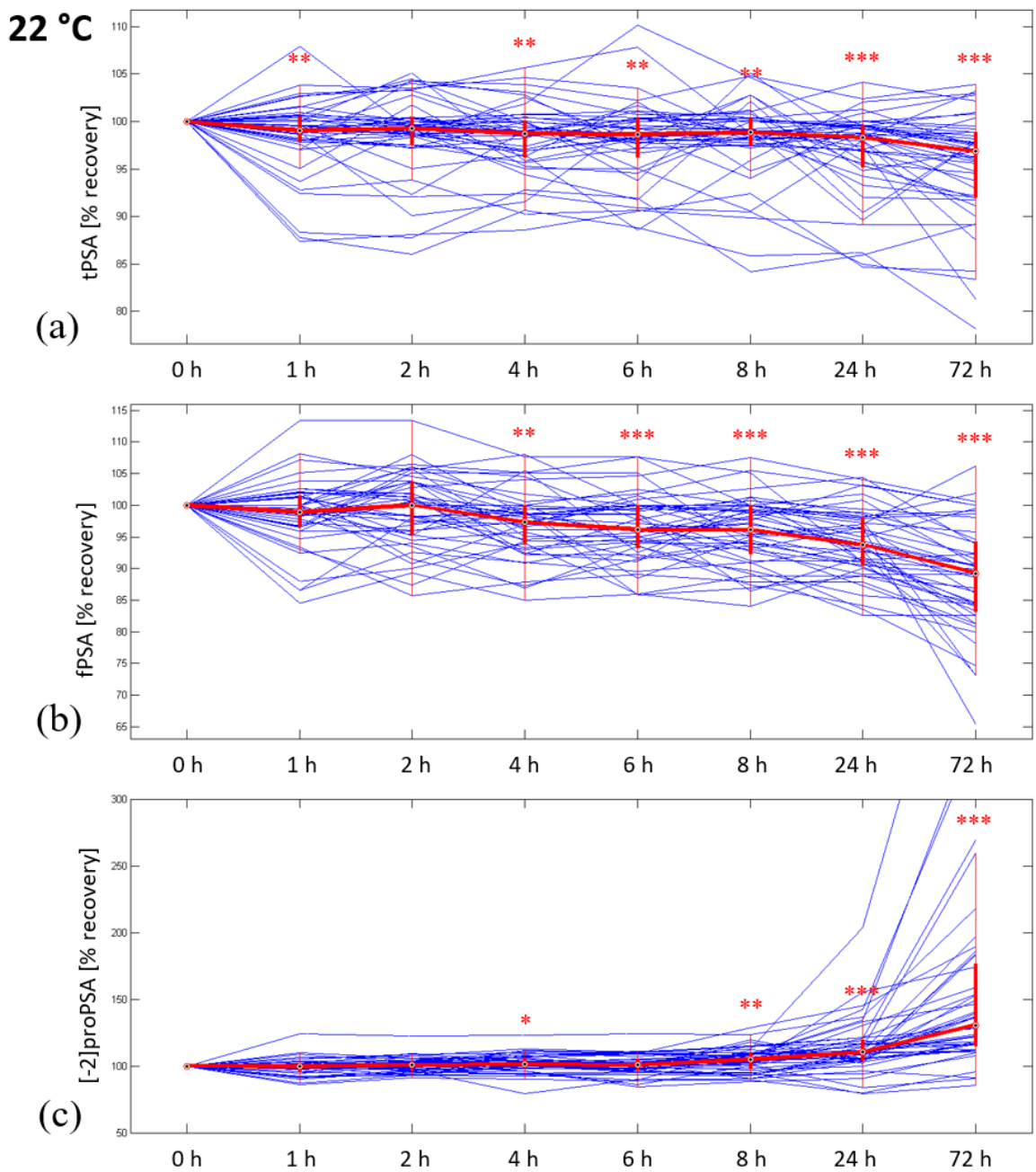
Čas	tPSA		fPSA		[-2]proPSA	
	4 °C	22 °C	4 °C	22 °C	4 °C	22 °C
<b>0 h (fresh)</b>	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)
<b>1 h</b>	99,0** (94,4–103,6)	99,1** (92,8–102,6)	100,0 (91,8–104,0)	98,9 (92,4–103,8)	99,8 (93,9–106,5)	99,8 (91,6–105,6)
<b>2 h</b>	98,8** (92,8–102,9)	99,3 (92,1–104,0)	98,6* (89,1–104,6)	100,0 (90,8–105,9)	98,8 (95,0–106,8)	100,6 (93,6–107,4)
<b>4 h</b>	98,1*** (91,3–101,7)	98,7** (92,4–102,8)	99,1 (91,2–106,1)	98,1** (90,9–105,2)	100,9 (94,4–109,4)	101,4* (94,3–110,2)
<b>6 h</b>	98,9** (92,4–102,8)	98,6** (90,9–102,1)	99,3* (89,5–103,5)	96,2*** (89,0–102,4)	100,8 (87,9–109,8)	100,7 (90,2–109,6)
<b>8 h</b>	98,9*** (90,8–101,7)	98,9** (90,5–102,8)	97,3** (88,4–104,3)	96,2*** (87,9–101,4)	100,3 (94,0–110,1)	105,0** (92,7–115,0)
<b>24 h</b>	99,2** (91,3–102,4)	98,3*** (89,2–100,9)	95,2*** (85,3–102,6)	93,8*** (83,6–104,0)	102,2* (96,1–111,6)	110,5*** (93,9–136,4)
<b>72 h</b>	98,5** (92,4–101,9)	96,9*** (87,5–102,2)	94,6*** (80,9–102,0)	89,2*** (78,2–100,0)	104,3*** (96,5–114,5)	130,5 *** (107,6–259,4)

*Legenda: hodnoty představují procento recovery naměřených biomarkerů v nastavených časových bodech při 4 °C a 22 °C; všechny hodnoty jsou uvedeny jako střední hodnoty s 10% – 90% kvantily uvedenými v závorkách; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; h – hodina.*



**Obrázek 24 - Stabilita tPSA, fPSA a [-2]proPSA ve vzorcích séra během skladování při 4 °C**

*Legenda: modrá linka – jeden pacient; černá tečka – střední hodnota; červená čára – spojnice středních hodnot; červený rámeček – mezikvartilové rozmezí (25 % – 50 %); slabá červená čára – rozsah dat, pokud nepřesahuje 1,5násobek mezikvartilového rozmezí; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .*



**Obrázek 25 - Stabilita tPSA, fPSA a [-2]proPSA ve vzorcích séra během skladování při 22 °C**

*Legenda: modrá linka – jeden pacient; černá tečka – střední hodnota; červená čára – spojnice středních hodnot; červený rámeček – mezikvartilové rozmezí (25 % – 50 %); slabá červená čára – rozsah dat, pokud nepřesahuje 1,5násobek mezikvartilového rozmezí; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .*

## Diskuze

Jak již bylo probráno v diskuzi výše, viz kapitola 3.2, preanalytická fáze je velmi důležitou součástí laboratorního vyšetření. Radí se sem i velmi důležitá část, kterou je příprava pacienta k odběru vzorku. Pro stanovení prostatických markerů je obzvláště doporučováno, že vzorky PSA musí být odebrány před manipulacemi s prostatou, jako je např. digitální rektální vyšetření, masáž prostaty, TRUS, biopsie prostaty. Všechny zmíněné procesy mohou způsobit přechodné zvýšení sérových hladin PSA. Hladinu zvyšuje i jízda na kole nebo na koni. V případě hraničního zvýšení se doporučuje opakované měření hladiny PSA. Transrektální punkční biopsie jehlou také způsobuje přetrvávající zvýšení hladiny PSA, proto se mezi punkční biopsií jehlou a odběrem vzorku na měření PSA doporučuje až šestitýdenní odstup [Fuchsová et al., 2014].

Přítomnost PSA je omezena na cytoplazmu prostatických acinárních buněk a duktálního epitelu. Pouze nepatrné množství PSA unikne do krve, kde lze změřit koncentraci menší než 4 µg/l. Pro představu, v seminální tekutině se PSA nachází v koncentraci 0,5–5 g/l [Hori et al., 2013]. Aby se PSA dostal do krve ve větší míře, musí překonat epitel prostaty a endotel cév. Prostup je vyšší, pokud tuto bariéru naruší patologický proces, např. nádor, zánět, BHP.

V posledních letech je věnována značná pozornost vlivu preanalytických podmínek na laboratorní výsledky. Je důležité znát podmínky, za kterých je molekula biomarkeru stabilní. Všechny biologické vzorky podléhají postupné degradaci, proto je pro potřeby správné interpretace laboratorních výsledků nutné znát stabilitu biomarkerů, která je velmi variabilní [Narayanan, 2000].

Tato studie byla zaměřena na stabilitu prostatických biomarkerů ve vzorcích séra, čili až po separaci z plné krve. Použití vzorků séra bylo v souladu s pokyny výrobce pro diagnostické soupravy. Aby se zabránilo vlivu buněčných složek (možným proteolytickým změnám), bylo sérum separováno do jedné hodiny po odběru krve. Časový limit pro zpracování krve byl původně stanoven podle pokynů výrobce, a to do 3 hodin od odběru krve [Beckman Coulter, 2022; Beckman Coulter, 2020]. Tento limit byl nakonec upraven podle dostupné literatury. Semjonov a kol. zaznamenali významné zvýšení koncentrací [-2]proPSA ve vzorcích plné krve při stání vzorku při RT za 3, 5 a 8 hodin. Doporučují tedy separaci krve nejpozději do 3 hodin po odběru [Semjonow et al., 2010]. Igawa a kol. doporučují separaci séra co nejdříve, již do 1 hodiny po odběru v případě plné krve, pokud se veškerá manipulace provádí při teplotě místnosti [Igawa et al., 2014]. Piironen a kol. zaznamenali významný pokles fPSA, v průměru o 0,6 % za hodinu, po opožděné separaci buněčné složky od séra [Piironen et al., 1996]. Také Forde a kol. zaznamenali pokles fPSA o 10,73 % za 24 hodin a o 11,22 % za 48 hodin ve vzorcích krve před odstředěním [Forde et al., 2016].

V této studii byla testována krátkodobá stabilita PSA markerů, postupovalo se podle upraveného protokolu ISBER. Jde o instituci známou svými odbornými znalostmi při určování osvědčených postupů úložišť, včetně podmínek skladování a přepravy [Snapes and Simeon-Dubach, 2022]. Protokol ISBER je standardizovaný nástroj pro preanalytické hodnocení a tento protokol byl úspěšně použit k testování stability také AMH [Vrzáková et al., 2023]. Zvolený protokol umožňuje simultánní testování stability během rozmrazování a zmrazování vzorků a stability analytů při různých teplotách; v tomto případě při 4 °C a 22 °C (RT). Jak již bylo zmíněno, tato studie byla zaměřena na podrobné testování krátkodobé

stability, při znalostech dlouhodobé stability tPSA a fPSA v hluboce zmrazených vzorcích séra. V literatuře lze najít práce, které se zabývali ještě dlouhodobější stabilitou tPSA a fPSA. Scaramuzzino et al. stanovovali tPSA a fPSA ve vzorcích séra skladovaných při -70 °C po dobu 5 let a Šimánek et al. po dobu 10 let [Scaramuzzino et al., 2007; Šimánek et al., 2018]. Oba týmy zjistily dobrou stabilitu obou markerů ve vzorcích séra skladovaných při -70 °C i po tak dlouhé době skladování.

Současná studie byla provedena ve dvou krocích. V prvním kroku byla testována stabilita při rozmrazování a zmrazování. Bylo zjištěno, že všechny biomarkery prostaty zůstaly stabilní při vystavení dvěma cyklům rozmrazení/zmrazení (tabulka 15). Ve výsledcích byly pozorovány určité statisticky významné změny. Nejvyšší změna byla 1,5 % v mediánu, avšak z klinického hlediska jsou takové malé změny nevýznamné. Lze tedy říci, že tPSA, fPSA a [-2]proPSA nejsou ovlivněny opakovaným zmrazováním vzorků séra na -80 °C. Piironen et al. prokázali, že fPSA a tPSA zůstávají stabilní i po 5 cyklech opakovaného rozmrazování a zmrazování [Piironen et al., 1996].

Jako druhý krok se současně testovala stabilita při dvou různých teplotách: 4 °C a 22 °C (RT). Obě skupiny alikvotů séra byly skladovány po dobu 1, 2, 4, 6, 8, 24 a 72 hodin.

Bylo zjištěno, že koncentrace tPSA ve vzorcích séra zůstaly stabilní při skladování při obou testovaných teplotách (tabulka 16, obrázek 24 a, 25 a). Sokoll et al. podobně prokázali stabilní koncentraci tPSA v 8 vzorcích séra oddělených do 2 hodin po odběru krve a skladovaných po dobu 4, 8, 24, 48 hodin a 1 týdne při teplotě místnosti a při 4 °C [Sokoll et al., 2002].

Co se týká stability fPSA, byl zaznamenán postupný pokles v průběhu času (tabulka 16, obrázek 24 b, 25 b). Klesající trend fPSA je viditelný při obou teplotách. Největší pokles fPSA byl pozorován v 72. hodině při teplotě 22 °C (10,8 %) a je již klinicky významný. Také několik studií se zaměřilo na stabilitu fPSA. Piironen et al. prokázali, že fPSA je méně stabilní ve vzorcích séra, plazmy EDTA a heparinové plazmy skladovaných jak při 4 °C, tak při RT, přičemž tito autoři definovali RT jako 30 °C. Zajímavé je, že zjistili 4,3% pokles sérového fPSA za den; tento pokles je více než čtyřikrát vyšší než pokles plazmatického fPSA u lithium-heparinu a EDTA. Podle stejných autorů by vzorky séra měly být skladovány zmrazené, pokud nejsou analyzovány ve stejný den. Po rozmrazení lze vzorky před analýzou skladovat maximálně 23 hodin při teplotě 4 °C [Piironen et al., 1996]. Také Cartledge et al. uvedli, že koncentrace fPSA v séru klesá již po 24 hodinách při skladování při 4 °C ( $p < 0,01$ ) [Cartledge et al., 1999].

Nejnovějším prostatickým biomarkerem je [-2]proPSA. Podle Semjonowa et al. mohou být vzorky séra skladovány při laboratorní teplotě nebo teplotě v chladničce (4 °C) až 48 hodin bez statisticky významného zvýšení [-2]proPSA. Vzorky séra skladované po delší dobu by měly být před testováním na [-2]proPSA skladovány zmrazené při -20 °C nebo nižších teplotách [Semjonow et al., 2010]. Igawa et al. uvádí, že stabilita [-2]proPSA je nižší než stabilita tPSA a fPSA. Nicméně [-2]proPSA zůstává stabilní po dobu nejméně 24 hodin jak při 4 °C, tak při teplotě místnosti [Igawa et al., 2014]. Naše studie zjistila postupný nárůst [-2]proPSA při obou teplotách (obrázek 24 c, 25 c) již po 24 hodinách. Po 72 hodinách při RT je nárůst nejen vysoce statisticky významný, ale také vysoce významný klinicky (30,5 %) (tabulka 16).

Semjonow et al. testovali dlouhodobou stabilitu [-2]proPSA ve vzorcích uchovávaných až 12 měsíců při -20 °C a -70 °C. Jejich výsledky ukazují, že tento biomarker zůstává stabilní během dlouhodobého zmrazení [Semjonow et al., 2010].

Kratší izoforma proPSA označovaná jako [-2]proPSA podle autorů Hori a Mikolajczyk již není dále štěpena a představuje proto stabilnější formu proPSA se serin-argininovým pro-leader peptidem, který je pravděpodobně odolnější vůči působení proteáz. Toto může hrát roli ve zvýšené naměřené koncentraci [-2]proPSA při delším skladování jak při 4 °C, tak při RT [Hori et al., 2013; Mikolajczyk et al., 2002]. Pravděpodobně nedochází k úplné degradaci molekuly, jen se zpočátku změní prostorová struktura tohoto proenzymu a poodhalí další vazebné místo (epitop) pro protilátku, kterou je tento proenzym stanovován.

### 3.4 Výsledky a jejich diskuze vztahující se k cíli 4

*Posouzení vlivu dodržování preanalytických podmínek na diagnostické využití tPSA, fPSA, [-2]proPSA, vypočítávaných parametrů poměru fPSA/tPSA a Indexu zdraví prostaty (PHI) a posouzení rizika při jejich nedodržení*

Z výsledků koncentrací tPSA, fPSA a [-2]proPSA uvedených v kapitole 3.3 byly vypočítány parametry:

#### **poměr fPSA/tPSA**

Vypočítané hodnoty tohoto poměru vyjádřené jako průměr a střední hodnota jsou shrnuty v tabulce 17.

**Tabulka 17 - Sumární statistiky výsledků poměru fPSA/tPSA**

Počítaný parametr fPSA/tPSA	Průměr [ng/ml]	Střední hodnota [ng/ml]
<b>Fresh vzorek</b>	0,141	0,117
R/Z cyklus 1	0,139	0,109
R/Z cyklus 2	0,137	0,109
Čas skladování při 4 °C		
1 h	0,139	0,108
2 h	0,137	0,110
4 h	0,139	0,108
6 h	0,137	0,108
8 h	0,136	0,112
24 h	0,131	0,107
72 h	0,124	0,100
Čas skladování při 22 °C		
1 h	0,136	0,106
2 h	0,139	0,110
4 h	0,135	0,105
6 h	0,137	0,108
8 h	0,135	0,108
24 h	0,133	0,101
48 h	0,129	0,102

*Legenda: fPSA/tPSA – poměr volného prostatického specifického antigenu k celkovému; fresh vzorek – poměr fPSA/tPSA v čerstvém vzorku před testováním stability; cyklus R/Z (rozmrazení/zmrazení) – rozmrazení 2 h při RT a následné zmrazení vzorku po dobu alespoň 24 hodin při -80 °C; h – hodina.*

$$\text{PHI} = ([-2]\text{proPSA} / \text{fPSA} \times \sqrt{\text{tPSA}})$$

Vypočítané hodnoty tohoto indexu vyjádřené jako průměr a střední hodnota jsou shrnuty v tabulce 18.

**Tabulka 18 - Sumární statistiky výsledků PHI**

Počítaný parametr PHI	Průměr [ng/ml]	Střední hodnota [ng/ml]
<b>Fresh vzorek</b>	25,402	25,490
R/Z cyklus 1	25,545	25,469
R/Z cyklus 2	25,988	26,072
Čas skladování při 4 °C		
1 h	25,490	26,423
2 h	25,900	25,241
4 h	25,800	24,623
6 h	25,677	25,462
8 h	26,522	25,365
24 h	27,358	28,071
72 h	28,957	29,500
Čas skladování při 22 °C		
1 h	25,523	25,126
2 h	25,666	25,147
4 h	25,976	25,215
6 h	26,480	25,247
8 h	27,661	27,358
24 h	31,789	29,411
72 h	43,915	40,506

*Legenda: PHI – Index zdraví prostaty; fresh vzorek – PHI v čerstvém vzorku před testováním stability; cyklus R/Z (rozmrazení/zmrazení) – rozmrazení 2 h při RT a následné zmrazení vzorku po dobu alespoň 24 hodin při -80 °C; h – hodina.*

#### **Cykly rozmrazování a zmrazování**

Výsledky testování rozmrazováním a zmrazováním jsou shrnuty v tabulce 19. Hodnoty fresh vzorků jsou uvedeny v prvním řádku, za nimi následují hodnoty procenta recovery po 1. a 2. cyklu rozmrazování a zmrazování. Profily měření jednotlivých markerů u každého pacienta jsou uvedeny na obrázku 26.

Změny v poměru fPSA/tPSA nebyly statisticky významné (obrázek 26 a). Hodnota PHI pro 2. cyklus rozmrazení/zmrazení byla asi o 2,5 % (ve střední hodnotě) vyšší než střední hodnota vypočítaná pro čerstvé vzorky (obrázek 26 b, tabulka 19). Protože toto platí pro



60 % vzorků, výsledky jsou statisticky významné. Zvýšení PHI o 2,5 % však klinicky významné není.

**Tabulka 19 - Sumární statistiky výsledků poměru fPSA/tPSA a PHI při testování stability rozmrazováním a zmrazováním**

<b>R/Z cyklus</b>	<b>Poměr fPSA/tPSA</b>	<b>PHI</b>
<b>0 (fresh)</b>	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)
<b>1</b>	100,0 (93,8–106,2)	99,6 (94,8–108,5)
<b>2</b>	100,0 (89,8–106,3)	102,5* (96,1–113,1)

*Legenda: hodnoty představují procento recovery naměřených biomarkerů po 1. a 2. cyklu rozmrazení/zmrazení; všechny hodnoty jsou uvedeny jako střední hodnoty s 10% – 90% kvantily uvedenými v závorkách; \*  $p < 0,05$ .*

### Stabilita při skladování při 4 °C a 22 °C

Procento recovery poměru fPSA/tPSA a PHI v nastavených časových bodech při 4 °C a 22 °C je shrnuto v tabulce 20. Profily měření jednotlivých parametrů u každého pacienta jsou uvedeny na obrázku 27 a 28.

Tabulka 20 - Sumární statistiky výsledků testování při skladování při 4 °C a 22 °C

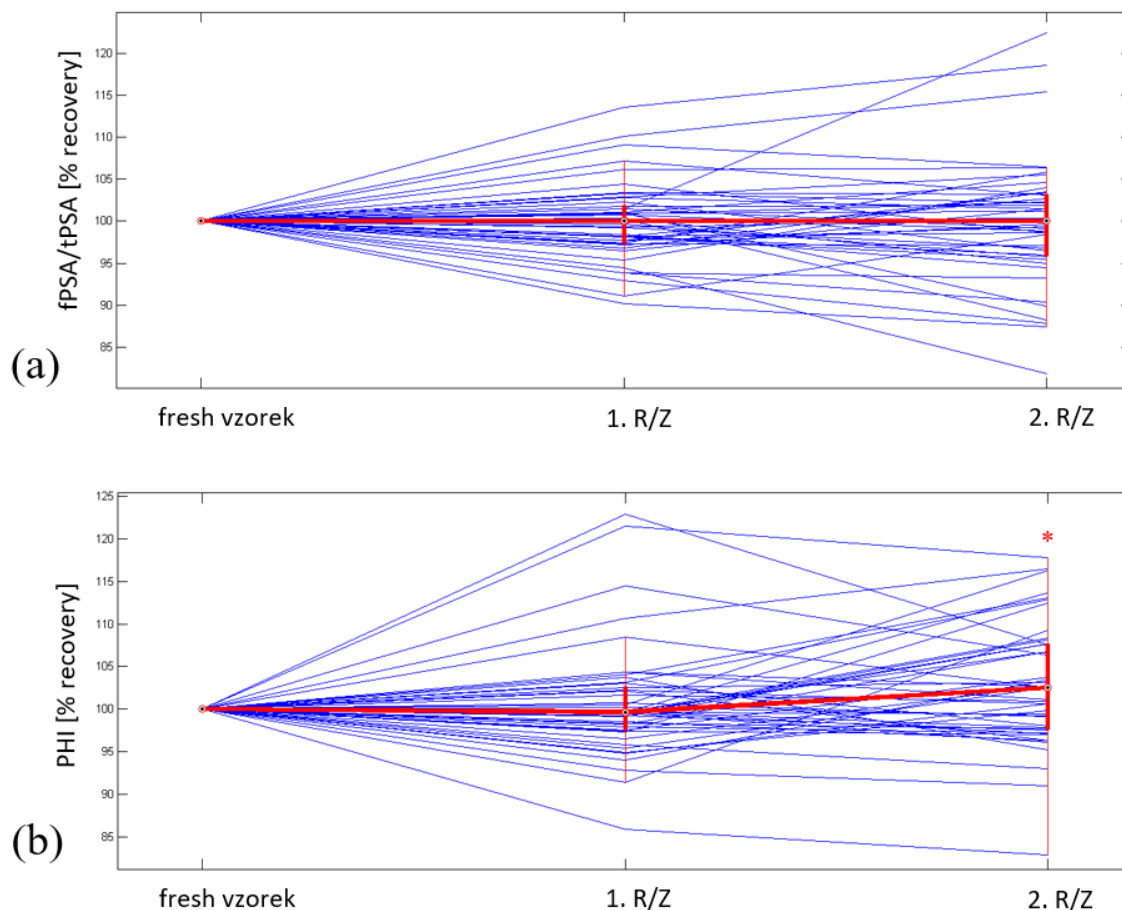
Čas	Poměr fPSA/tPSA		PHI	
	4 °C	22 °C	4 °C	22 °C
0 h (fresh)	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)	100,0 (100,0–100,0)
1 h	100,0 (92,9–109,3)	100,5 (94,3–109,8)	100,3 (92,2–111,3)	100,5 (90,1–110,1)
2 h	99,7 (90,6–108,7)	101,0 (92,5–109,8)	102,1 (92,6–112,6)	102,2 (89,5–109,0)
4 h	100,8 (92,0–110,5)	100,1 (91,2–108,1)	102,1 (88,0–111,9)	103,2** (90,0–117,0)
6 h	99,3 (92,5–106,4)	98,3 (90,8–109,8)	102,5 (84,4–114,3)	104,9** (90,3–118,3)
8 h	98,7 (88,8–107,6)	97,3 (89,3–107,2)	103,7* (90,3–118,5)	107,3*** (91,8–128,6)
24 h	97,0* (86,9–108,5)	97,3 (84,5–113,5)	107,1*** (96,8–121,3)	112,9*** (91,7–152,1)
72 h	96,3*** (82,7–107,3)	92,9** (80,1–109,4)	113,5*** (99,7–132,7)	144,7*** (113,9–278,3)

Legenda: Procento recovery poměru PHI a fPSA/tPSA v nastavených časových bodech při 4 °C a 22 °C. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako střední hodnoty s 10%–90% kvantily uvedenými v závorkách. Legenda: h hodina; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Procento recovery poměru fPSA/tPSA při 4 °C zůstalo relativně stabilní až do bodu 72 hodin, kdy byl pozorován pokles o 3,7 % (ve střední hodnotě) (obrázek 27 a). Tak malý rozdíl není klinicky významný. Poměr fPSA/tPSA při teplotě místnosti se po 72 hodinách snížil o 7,1 % (ve střední hodnotě) (obrázek 28 a). Tento nálezn byl statisticky významný a lze jej hodnotit i jako hraničně klinicky významný.

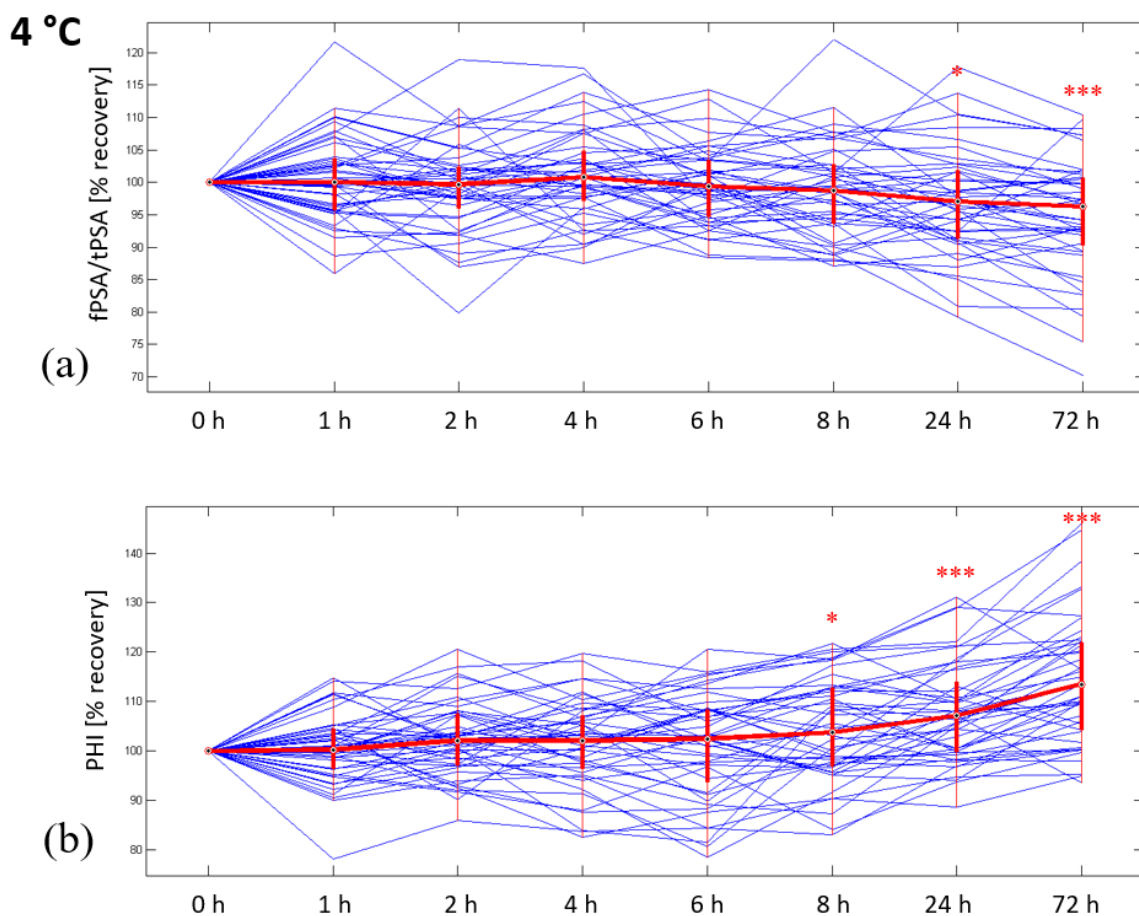
PHI vykazoval postupné zvyšování procenta recovery při obou teplotách. Při 4 °C začalo statisticky významné zvýšení v bodě 8 hodin a stalo se hraničně klinicky významným po 24 hodinách, se zvýšením o 7,1 % (ve střední hodnotě) (obrázek 27 b). Při 22 °C začalo statisticky významné zvýšení v bodě 4 hodin a stalo se hraničně klinicky významným v bodě

8 hodin se zvýšením o 7,3 % (ve střední hodnotě). Počínaje 8. hodinou při teplotě místnosti byl pozorován prudký nárůst s téměř 50% zvýšením PHI (ve střední hodnotě) po 72 hodinách (obrázek 28 b).



**Obrázek 26 – Stabilita poměru fPSA/tPSA a PHI ve vzorcích séra během rozmrazování a zmrazování**

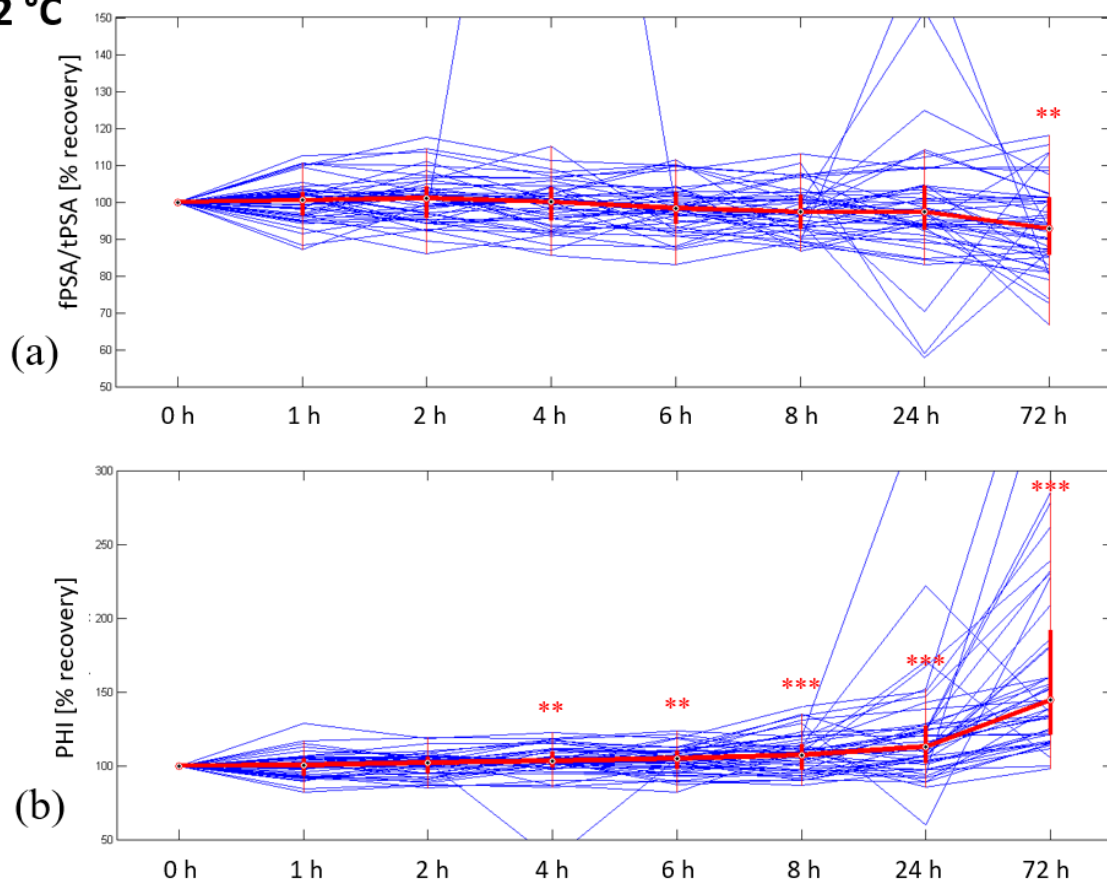
*Legenda: modrá linka – jeden pacient; černá tečka – střední hodnota; červená čára – spojnice středních hodnot; červený rámeček – mezikvartilové rozmezí (25 % – 50 %); slabá červená čára – rozsah dat, pokud nepřesahuje 1,5násobek mezikvartilového rozmezí; \*  $p < 0,05$ .*



**Obrázek 27 – Stabilita poměru fPSA/tPSA a PHI ve vzorcích séra během skladování při 4 °C**

*Legenda: modrá linka – jeden pacient; černá tečka – střední hodnota; červená čára – spojnice středních hodnot; červený rámeček – mezikvartilové rozmezí (25 % – 50 %); slabá červená čára – rozsah dat, pokud nepřesahuje 1,5násobek mezikvartilového rozmezí; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .*

22 °C



**Obrázek 28 – Stabilita poměru fPSA/tPSA a PHI ve vzorcích séra během skladování při 22 °C**

*Legenda: modrá linka – jeden pacient; černá tečka – střední hodnota; červená čára – spojnice středních hodnot; červený rámeček – mezikvartilové rozmezí (25 % – 50 %); slabá červená čára – rozsah dat, pokud nepřesahuje 1,5násobek mezikvartilového rozmezí; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .*

## Diskuze

Tato část práce se věnuje posouzení vlivu dodržování preanalytických podmínek na diagnostické využití tPSA, fPSA, [-2]proPSA a vypočítávaných parametrů fPSA/tPSA a PHI. Také se zde diskutuje posouzení rizika při nedodržení vhodných preanalytických podmínek.

Běžně používané měření tPSA v séru je dobrým diagnostickým nástrojem PCa, které vedlo ke snížení mortality. Ačkoli je sérový tPSA užitečným indikátorem PCa, jeho pouhá přítomnost není pro PCa specifická a zvýšené hodnoty tPSA lze pozorovat také u nemaligních stavů spojených s BHP nebo prostatitidou. Použití tPSA jako biomarkeru proto může vést ke zbytečným biopsiím pro falešně pozitivní výsledky [Loeb and Catalona, 2014]. V průběhu let bylo objeveno několik dalších molekulárních forem PSA (viz. kapitola 1.8.1.), z nichž některé jsou specifičtější pro PCa. Jedná se především o fPSA a [-2]proPSA, ze kterých se počítají parametry fPSA/tPSA a PHI.

U prvního z vypočítávaných parametrů fPSA/tPSA bylo prokázáno, že poměr fPSA/tPSA významně zlepšuje diferenciálně diagnostické odlišení PCa od benigních onemocnění prostaty. Pokud je tento poměr vyšší než 0,25, jedná se o benigní onemocnění. Naopak, pokud je tento poměr menší než 0,15, je zde zvýšené riziko maligního nádoru [Jung et al., 2000]. Je tedy vhodné rozšířit vyšetření o další diagnostické metody [Sedláčková et al., 2021].

V současné době se používá jako součást PSA panelu při diagnostice PCa PHI. Protože se jedná o matematický model (vyvinutý firmou Beckman Coulter), který pro výpočet využívá stanovení koncentrací tří prostatických markerů, mají znalosti stability těchto molekul velkou důležitost. Podle studií celé řady zahraničních i českých autorů PHI dobře koreluje s histologií PCa, tzv. Gleason skóre, který hodnotí stupeň diferenciace nádorů prostaty. Stanovení PHI zvyšuje klinickou specifitu detekce PCa, umožňuje přesnější zhodnocení rizika pro jednotlivého pacienta a snížení počtu biopsií a rebiopsií prostaty [Anyango et al., 2021; Fan et al., 2021; Barisiene et al., 2020; Fuchsova et al., 2015].

Protože se stanovení prostatických biomarkerů používá jako jeden z nástrojů pro stanovení diagnózy PCa, mohou falešně vysoké nebo nízké hodnoty ovlivnit lékaře při stanovování správné diagnózy nebo vhodné terapie. O léčbě je rozhodováno na základě měření biomarkerů prostaty v kombinaci s výsledky biopsie a zobrazovacími metodami [Sedláčková et al., 2021]. Je proto nesmírně důležité znát preanalytické podmínky jednotlivých prostatických markerů, aby bylo možné učinit správná rozhodnutí. Kritéria pro zařazení do studie byla stanovena v souladu s EAU Guidelines on Cancer Prostate. Směrnice EAU zmiňují užitečnost měření [-2]proPSA a další hodnotu výpočtu PHI při snaze zlepšit predikce týkající se klinicky významného PCa u mužů s hodnotami tPSA mezi 2–10 ng/ml [EAU Guidelines, 2023]. Zdraví jedinci a pacienti s BHP byli proto zahrnuti za předpokladu, že měli základní hodnoty tPSA v těchto rozmezích. Podle výsledků uvedených v této práci a také výsledků z literatury je hlavním problémem nestability prostatických markerů vyšší pravděpodobnost falešné positivity na základě měření [-2]proPSA a následného výpočtu PHI. Do studie proto byli zahrnuti zdraví jedinci a pacienti s BHP a vyloučeni pacienti s PCa. Toto poskytlo příležitost pozorovat a vyhodnotit zkreslení směrem k falešně pozitivním výsledkům, které jsou dané naměřením vyšších hodnot.

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole 3.3, v této studii byla prokázána velká stabilita všech prostatických biomarkerů při vystavení jednomu nebo dvěma cyklům rozmrazování. Lze tedy říci, že ani oba počítané parametry fPSA/tPSA a PHI nejsou opakovaným přemražením vzorků séra na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  nijak ovlivněny (obrázek 26 a, b).

Jiná situace nastala při skladování při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kdy docházelo k postupnému snižování fPSA a naopak ke zvyšování [-2]proPSA ve vzorcích séra. Při skladování těchto vzorků při teplotě  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  jsou hodnoty těchto dvou biomarkerů ještě více změněny. Pokles fPSA má za následek nižší poměr fPSA/tPSA (obrázek 27 a, 28 a). Protože u prvního počítaného parametru fPSA/tPSA se snižující se hodnotou tohoto poměru se zvyšuje pravděpodobnost maligního tumoru [Jung et al., 2000], může vést dlouhodobé skladování vzorků séra při této teplotě k falešně nízkému poměru. Také na druhý počítaný parametr PHI mají velký vliv koncentrace fPSA a [-2]proPSA, tedy méně stabilní biomarkery. Protože je v tomto indexu [-2]proPSA v poměru k fPSA, dochází při zvýšení [-2]proPSA a současném snížení fPSA zákonitě ke zvýšení celého PHI. A to dokonce nad  $40\text{ ng/ml}$  ( $40,506$  ve střední hodnotě vzorků pacientů v naší studii), což je cut-off hodnota. Jedná se tedy o falešně pozitivní výsledek s falešným rizikem PCa.

Cartledge et al. uvádějí, že koncentrace fPSA v séru klesá již po 24 hodinách při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,01$ ), což má za následek vliv na poměr fPSA/tPSA. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.8.2, stanovení tohoto poměru se používá pro diferenciální diagnostiku PCa a BHP [Hou et al., 2020; Cartledge et al., 1999]. Vzhledem k tomu, že agresivní formy rakoviny prostaty jsou spojeny s nižším poměrem fPSA/tPSA, mohou tyto výsledky vést k provedení zbytečné biopsie. Výše zmíněná studie Sokolla et al. také zkoumala vliv stability tPSA a fPSA na vypočítaný poměr. U vzorků séra prokázali pokles fPSA v průběhu času a tím vliv na % fPSA ve vzorcích séra jak při RT, tak při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Autoři vyhodnotili tento pokles jako přibližně 5% v čase 4 hodin, 5–10% v čase 24 hodin a 20–30% po 1 týdnu [Sokoll et al., 2002].

PHI je matematický vzorec pro hodnocení výsledků biomarkerů prostaty stanovených v séru a vznikl ve snaze zvýšit efektivitu diagnostického procesu [Anyango et al., 2021]. Jelikož se jedná o vypočítaný index, který využívá všechny měřené parametry (tPSA, fPSA, [-2]proPSA), jakákoliv změna kteréhokoli z nich jej může ovlivnit. Pokud tedy dojde ke snížení fPSA a zvýšení [-2]proPSA v důsledku nedodržení správných preanalytických podmínek, může být PHI v důsledku toho vyšší. Tato skutečnost byla prokázána v této studii, PHI se v průběhu času postupně zvyšoval (obrázek 27 b, 28 b). V některých individuálních případech, při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a zejména při RT, byl pozorován dramatický nárůst hodnot PHI. Nárůst PHI byl v některých případech tak významný, že mohl vést nejen k falešně pozitivnímu závěru o přítomnosti PCa, ale mohl být dokonce považován za známku pokročilého PCa s možností metastáz. Nejextrémnější výsledek byl pozorován u pacienta, který je v péči FN přes 10 let. Počáteční hodnoty u tohoto pacienta byly: tPSA =  $7,90\text{ ng/ml}$  a PHI =  $29,7$ . Při  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  (RT) zůstala hodnota tPSA stabilní (po 24 h tPSA =  $7,97\text{ ng/ml}$ ; po 72 h tPSA =  $8,12\text{ ng/ml}$ ). Mírný pokles fPSA a významný nárůst [-2]proPSA však způsobily dramatický nárůst PHI (po 24 h PHI =  $68,4$ ; po 72 h PHI =  $167$ ). Paradoxně tento pacient podstoupil biopsii třikrát při dlouhodobém aktivním sledování a výsledky byly vždy negativní. Na základě této zkušenosti je možno tvrdit, že v případě podezření na nesprávnou skladovací teplotu (např. při přepravě vzorků séra) by měla být krev vždy znovu odebrána. Tento problém je zmíněn i v literatuře. Igawa et al. hledali optimální preanalytické podmínky

pro tPSA, fPSA a [-2]proPSA a zjišťovali jejich vliv na PHI. Zjistili, že hodnota PHI je nejvíce ovlivněna hodnotou [-2]proPSA, která se postupem času zvýšila, a fPSA, která se snížila. U vzorků séra došlo ke statisticky významnému zvýšení hodnoty PHI již po 3 h, téměř o 10 % při 22 °C (RT) a po 24 h při teplotě 4 °C [Igawa et al., 2014].



## 4 Závěry

### 4.1 Závěry vztahující se k cíli 1

#### *Zjištění optimálních preanalytických podmínek Anti-Mülleriánského hormonu (AMH)*

Výsledky v předkládané práci prokázaly, že koncentrace AMH v různých preanalytických podmínkách zůstávají poměrně stabilní. Nejvíce stabilní byly vzorky séra skladované při -20 °C, a také při 4 °C. Nejmenší stabilitu vykazovala skupina vzorků plazmy a séra, které byly skladované při 22 °C. Druhou nejméně stabilní skupinou se jevily vzorky plazmy při opakovaném rozmrazování a skladování při 4 °C.

Na základě této studie je možno vydat doporučení pro laboratoře:

- typ vzorku sérum (i přesto, že je možné dle výrobce diagnostických souprav používat plazmu)
- transport vzorků do laboratoře při 4 °C
- separace z plné krve do 8 h (do konce směny)
- skladování vzorků při -20 °C
- vzorky maximálně 2x rozmrazit.

AMH je běžně používaný biomarker v klinické praxi a na základě jeho měření jsou přijímána důležitá rozhodnutí. Bohužel znalost jeho biologické variability a obeznamenost se všemi jeho izoformami a jejich jednotlivými funkcemi není úplná. Studie stability molekuly AMH jsou proto o to důležitější, i když jsou prováděny s výše uvedenými omezeními.

## 4.2 Závěry vztahující se k cíli 2

### *Posouzení vlivu dodržování preanalytických podmínek na klinické využití AMH a posouzení rizik při jejich nedodržení*

Tato studie ukázala, že pokles koncentrace AMH v průběhu času při absenci vhodných preanalytických podmínek může vést k naměření nízkých koncentrací AMH ve vzorcích séra i plazmy, které neodpovídají skutečnosti.

Přesné měření hladin AMH je jedním z nejdůležitějších faktorů pro odhad ovariální odpovědi na IVF a volbu správného protokolu – základ úspěšného oplodnění [Moolhuijsen and Visser, 2020]. Falešně nízké hladiny AMH mohou vést ke stimulaci vyššími dávkami gonadotropinů než by bylo pro danou ženu optimální, což může vést k hyperstimulaci a v krajním případě k vyvolání OHSS jako závažné komplikace.

### 4.3 Závěry vztahující se k cíli 3

#### *Zjištění optimálních preanalytických podmínek celkového prostatického specifického antigenu (tPSA), jeho volné frakce (fPSA) a prekursoru [-2]proPSA*

Tato studie prokázala vysokou stabilitu tPSA za různých zátěžových podmínek, naopak stabilita fPSA i [-2]proPSA se ukázala jako nižší. Koncentrace fPSA v čase během zátěžových podmínek klesala, koncentrace [-2]proPSA se naopak zvyšovala. Ke zvýšení [-2]proPSA dochází již po 24 hodinách. Protože se při výpočtu PHI používá [-2]proPSA, každé zvýšení ovlivní konečnou hodnotu tohoto indexu. Všechny zvýšené hodnoty [-2]proPSA by tedy měly být vždy pečlivě vyhodnoceny.

Z výsledků této práce vyplývá: pokud se vzorek dostane do laboratoře až druhý den po náběru a je podezření, že nebyl uchovávan v chladu při 4 °C, existuje zde reálné riziko falešně pozitivních (v případě [-2]proPSA) nebo falešně negativních (v případě fPSA) výsledků.

Na základě této studie je možno vydat doporučení pro laboratoře:

- transport vzorků do laboratoře při 4 °C
- separace z plné krve do 8 h (do konce směny)
- skladování vzorků při -20 °C.

Pokud nejsou dodrženy tyto podmínky hlavně pro stanovení [-2]proPSA, je nutné požádat o nový odběr vzorku.

#### 4.4 Závěry vztahující se k cíli 4

*Posouzení vlivu dodržování preanalytických podmínek na diagnostické využití tPSA, fPSA, [-2]proPSA, vypočítávaných parametrů poměru fPSA/tPSA a Indexu zdraví prostaty (PHI) a posouzení rizika při jejich nedodržení*

Nedodržení správných transportních a skladovacích podmínek může vést, jak bylo prokázáno v kapitole 3.3, ke snížení koncentrace fPSA a zároveň ke zvýšení koncentrace [-2]proPSA. V důsledku toho dojde k výraznému zvýšení PHI. Hodnota PHI je tak falešně pozitivní, což znamená falešně vysoké riziko PCa.

Při podezření na PCa je pacient znovu zbytečně podroben dalšímu vyšetření: USG, MR prostaty, biopsie (rebiopsie), kontrolní náběry. Během těchto vyšetření se mohou objevit komplikace či nežádoucí účinky, zejména pak u biopsie prostaty. Samo podezření na onkologické onemocnění je spojeno s nadměrnou psychickou zátěží pacienta a jeho rodiny.

Zabránění over diagnostice PCa má zcela nepochybně dopad nejen zdravotnický a psychologický, ale také ekonomický.

#### **4.5 Závěry pro praxi a výhled do budoucna**

Výsledky uvedené v disertační práci ukazují na vysokou důležitost dodržování správné laboratorní praxe. Jde o soubor pravidel sloužící k zajištění kvality vydávaných výsledků. Nedodržení preanalytických podmínek může ovlivnit výsledek laboratorního vyšetření, ten se pak stává zavádějící informací pro lékaře a může vést k nesprávnému klinickému rozhodnutí. Další výzkum v oblasti preanalytiky může rozhodně přispět ke zkvalitnění diagnosticko-léčebného procesu.

V současné době se objevují stále nové, specifitější a citlivější biomarkery, které umožňují včasnou diagnostiku i výběr vhodné léčebné metody. Proto také vzrůstá potřeba podrobného výzkumu jejich vlastností.

## 5 Seznam použité literatury

ALABED ALIBRAHIM, Eid, Samuel LEGEAY, Pierre-André BILLAT, Emmanuelle BICHON, Ingrid GUIFFARD et al. (2020). *In vivo comparison of the proangiogenic properties of chlordecone and three of its dechlorinated derivatives formed by in situ chemical reduction*. Environmental Science and Pollution Research International. Online. 11., vol. 27, no. 33, s. 40953–40962. ISSN 1614-7499. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04353-5>. [cit. 2023-08-23].

ANDERSON, Richard A. and H. Irene SU (2020). *The Clinical Value and Interpretation of Anti-Müllerian Hormone in Women With Cancer*. Frontiers in Endocrinology. Online. 7.10., vol. 11, s. 574263. ISSN 664-2392. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.574263>. [cit. 2023-04-28].

*Ovarian hyperstimulation syndrome* (2008). Fertility and Sterility. Online. 1.11., vol. 90, no. 5, Supplement, 2008 Compendium of Practice Committee Reports, s. S188–S193. ISSN 0015-0282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.034>. [cit. 2023-08-21].

ECIS (2020). *European Cancer Information System*. Online. Dostupné z: [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?\\$0-0\\$1-CZ\\$4-1\\$3-All\\$6-0,14\\$5-2020,2020\\$7-7\\$2-All\\$CEstByCancer\\$X0\\_8-3\\$CEstRelativeCanc\\$X1\\_8-3\\$X1\\_9-AE27\\$CEstBySexByCancer\\$X2\\_8-3\\$X2\\_-1-1](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?$0-0$1-CZ$4-1$3-All$6-0,14$5-2020,2020$7-7$2-All$CEstByCancer$X0_8-3$CEstRelativeCanc$X1_8-3$X1_9-AE27$CEstBySexByCancer$X2_8-3$X2_-1-1). [cit. 2023-08-24].

ANYANGO, Ruth, Joel OJWANDO, Clifford MWITA and Edward MUGALO (2021). *Diagnostic accuracy of [-2]proPSA versus Gleason score and Prostate Health Index versus Gleason score for the determination of aggressive prostate cancer: a systematic review*. JBI Evidence Synthesis. Online. 6., vol. 19, no. 6, s. 1263. ISSN 2689-8381. Dostupné z: <https://doi.org/10.11124/JBISRIR-D-19-00194>. [cit. 2023-05-12].

BAARENDS, W. M., M. J. VAN HELMOND, M. POST, P. J. VAN DER SCHOOT, J. W. HOOGERBRUGGE et al. (1994). *A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct*. Development (Cambridge, England). Online. 1., vol. 120, no. 1, s. 189–197. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.120.1.189>. [cit. 2023-05-02].

BAKER, Marilyn L., Sylvia A. METCALFE and John M. HUTSON (1990). *Serum Levels of Mullerian Inhibiting Substance in Boys from Birth to 18 Years, as Determined by Enzyme Immunoassay\**. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. Online. 1.1., vol. 70, no. 1, s. 11–15. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/jcem-70-1-11>. [cit. 2023-07-21].

BALKO, Jan, Zbyněk TONAR and Ivan VARGA (2017). *Memorix histologie. 2*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7553-249-7.

BARISIENE, Marija, Arnas BAKAVICIUS, Diana STANCIUTE, Jolita JURKEVICIENE, Arunas ZELVYS et al. (2020). *Prostate Health Index and Prostate Health Index Density as Diagnostic Tools for Improved Prostate Cancer Detection*. BioMed Research International.

Online. 21.7., vol. 2020, s. 9872146. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2020/9872146>. [cit. 2023-05-26].

BARTOŠ, Vladimír, Kristián ŠAFARČÍK, Marie KARLÍKOVÁ, Ondřej TOPOLČAN, Radek KUČERA and Jindra WINDRICHOVÁ (2013). *Principy imunoanalytických metod pro mediky*. Online. Dostupné z: <https://oid.fnplzen.cz/sites//users/oid/skripta%20Principy%20imunoanalytick%C3%BDch%20metod%20%282%29.pdf>. [cit. 2023-02-19].

BECKMAN COULTER (2022). *Access Hybritech PSA*. Dostupné z: A85067R (beckmancoulter.com). [cit. 2024-02-19].

BECKMAN COULTER (2020). *Access Hybritech freePSA*. Dostupné z: [phxA37447P-EN\\_US](phxA37447P-EN_US) (beckmancoulter.com). [cit. 2024-02-19].

BECKMAN COULTER (2020). *Access Hybritech p2PSA*. Dostupné z: <A80984N> (beckmancoulter.com). [cit. 2024-02-19].

BENTZEN, J. G., J. L. FORMAN, A. PINBORG, Ø. LIDEGAARDET, E. C. LARSEN et al. (2012). *Ovarian reserve parameters: a comparison between users and non-users of hormonal contraception*. Reproductive Biomedicine Online. Online. 12., vol. 25, no. 6, s. 612–619. ISSN 1472-6491. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.09.001>. [cit. 2023-05-22].

BERNARDI, Lia A., Marissa Steinberg WEISS, Anne WALDO, Quaker HARMON, Mercedes R. CARNETHON et al. (2021). *Duration, Recency, and Type of Hormonal Contraceptive Use and Anti-Müllerian Hormone Concentrations*. Fertility and sterility. Online. 7., vol. 116, no. 1, s. 208–217. ISSN 0015-0282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.02.007>. [cit. 2023-05-05].

BETSOU, Fotini, Elaine GUNTER, Judith CLEMENTS, Yvonne DESOUZA, Katrina A.B. GODDARD et al. (2013). *Identification of Evidence-Based Biospecimen Quality-Control Tools*. The Journal of Molecular Diagnostics. Online. 1., vol. 15, no. 1, s. 3–16. ISSN 15251578. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.06.008>. [cit. 2023-04-28].

BOEGEMANN, Martin, Carsten STEPHAN, Henning CAMMANN, Sébastien VINCEDEAU, Alain HOULGATTE et al. (2016). *The percentage of prostate-specific antigen (PSA) isoform [-2]proPSA and the Prostate Health Index improve the diagnostic accuracy for clinically relevant prostate cancer at initial and repeat biopsy compared with total PSA and percentage free PSA in men aged ≤65 years*. BJU International. Online. vol. 117, no. 1, s. 72–79. ISSN 1464-410X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/bju.13139>. [cit. 2023-05-12].

BOYANTON, Bobby L. and Kenneth E. BLICK, (2002). Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clinical Chemistry*. 12., vol. 48, no. 12, s. 2242–2247. ISSN 0009-9147. PMID: 12446483.

BRADY, Paula C. and Elizabeth S. GINSBURG (2018). *Antimüllerian hormone: Don't put all the eggs in one basket*. Fertility and Sterility. Online. 8., vol. 110, no. 3, s. 412. ISSN 00150282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.001>. [cit. 2023-04-28].

BROEKMANS, Frank J., Jenny A. VISSER, Joop S.E. LAVEN, Simone L. BROER, Axel P.N. THEMMEN et al. (2008). *Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction*. Trends in Endocrinology & Metabolism. Online. 11., vol. 19, no. 9, s. 340–347. ISSN 10432760. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.08.002>. [cit. 2023-04-28].

BURATINI, Jose, Thaisy Tino DELLAQUA, Mariabeatrice DAL CANTO, Antonio LA MARCA, Domenico CARONE et al. (2022). *The putative roles of FSH and AMH in the regulation of oocyte developmental competence: from fertility prognosis to mechanisms underlying age-related subfertility*. Human Reproduction Update. Online. 1.4., vol. 28, no. 2, s. 232–254. ISSN 1355-4786. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab044>. [cit. 2023-08-21].

CAMPBELL, Lori D., Jonas J. ASTRIN, Yvonne DESOUZA, Judith GIRI, Ashokkumar A. PATEL et al. (2018). *The 2018 Revision of the ISBER Best Practices: Summary of Changes and the Editorial Team's Development Process*. Biopreservation and Biobanking. Online. 1.2., vol. 16, no. 1, s. 3–6. ISSN 1947-5535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0001>. [cit. 2023-05-05].

CARTLEDGE, J. J., D. THOMPSON, H. VERRIL, P. CLARKSON and I. EARDLEY (1999). *The stability of free and bound prostate-specific antigen*. BJU International. Online. vol. 84, no. 7, s. 810–814. ISSN 1464-410X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1999.00311.x>. [cit. 2023-07-18].

CATALONA, William J., Alan W. PARTIN, Martin G. SANDA, John T. WEI, George G. KLEE et al. (2011). *A Multi-Center Study of [-2]Pro-Prostate-Specific Antigen (PSA) in Combination with PSA and Free PSA for Prostate Cancer Detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL PSA Range*. The Journal of urology. Online. 5., vol. 185, no. 5, s. 1650–1655. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.12.032>. [cit. 2023-05-12].

CATE, R. L., R. J. MATTALIANO, C. HESSION, R. TIZARD, N. M. FARBER et al. (1986). *Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells*. Cell. Online. 6.6., vol. 45, no. 5, s. 685–698. ISSN 0092-8674. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90783-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90783-X). [cit. 2023-04-28].

CHANG, H. L., N. PAHLAVAN, E. F. HALPERN, D. T. MACLAUGHLIN (2009). *Serum Müllerian Inhibiting Substance/anti-Müllerian hormone levels in patients with adult granulosa cell tumors directly correlate with aggregate tumor mass as determined by pathology or radiology*. Gynecologic Oncology. Online. 8.4., vol. 114, no 1, s. 57–60. ISSN 1095-6859. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.02.023>. [cit. 2023-08-21].

CLARKE, Trent R., Yasunori HOSHIYA, Soyun E. YI, Xiaohong LIU, Karen M. LYONS et al. (2001). *Müllerian Inhibiting Substance Signaling Uses a Bone Morphogenetic Protein (BMP)-Like Pathway Mediated by ALK2 and Induces Smad6 Expression*. Molecular Endocrinology. Online. 1.6., vol. 15, no. 6, s. 946–959. ISSN 0888-8809. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/mend.15.6.0664>. [cit. 2023-08-18].

COHEN-HAGUENAUER, O., J. Y. PICARD, M. G. MATTÉI, S. SERERO, V. C. NGUYEN et al. (1987). *Mapping of the gene for anti-müllerian hormone to the short arm*



of human chromosome 19. *Cytogenetics and Cell Genetics*. Online. vol. 44, no. 1, s. 2–6. ISSN 0301-0171. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000132332>. [cit. 2023-05-02].

ČAPOUN, Otakar, Milan KRÁL, Ivo MINÁRIK, Vojtěch NOVÁK and Hana SEDLÁČKOVÁ (2022). *Karcinom prostaty*. Online. Praha: Ipsen Pharma, s.r.o.; Česká urologická společnost. Dostupné z: [IPSEN\\_Karcinom\\_prostaty\\_CZ.pdf \(cus.cz\)](https://www.ipsenpharma.cz/ipsen/karcinom-prostaty-cz.pdf) [cit. 2023-05-24].

ČAPOUN, Otakar (2021). Vyšetřovací algoritmy u karcinomu prostaty – 1. část. *Urologie pro praxi*. Online. 4.2., vol. 22, no. 2, s. 88–91. ISSN 1803-5299. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2021/02/07.pdf>. [cit. 2024-03-04].

ČIHÁK, Radomír (2013). *Anatomie 2*. 3rd ed. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4788-0.

DEMIRDJIAN, Gaiane, Stephanie BORD, Caroline LEJEUNE, Ryan MASICA, Dominique RIVIÈRE et al. (2016). *Performance characteristics of the Access AMH assay for the quantitative determination of anti-Müllerian hormone (AMH) levels on the Access\* family of automated immunoassay systems*. *Clinical Biochemistry*. Online. 11., vol. 49, no. 16–17, s. 1267–1273. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.08.005>. [cit. 2023-04-28].

DEVLIN, Conor M., Matthew S. SIMMS and Norman J. MAITLAND (2021). *Benign prostatic hyperplasia – what do we know?* *BJU International*. Online. 4., vol. 127, no. 4, s. 389–399. ISSN 1464-4096, 1464-410X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/bju.15229>. [cit. 2023-04-28].

DI CLEMENTE, Nathalie, Cheryl WILSON, Emmanuelle FAURE, Laurence BOUSSIN, Paul CARMILLO et al. (1994). *Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone*. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*. Online. 8., vol. 8, no. 8, s. 1006–1020. ISSN 0888-8809. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/mend.8.8.7997230>. [cit. 2023-0-02].

DVOŘÁK, Jan (2014). *Radioterapie karcinomu prostaty*. *Onkologie*. Online. 1.3., vol. 8, no. 1, s. 19-22. ISSN 18024475. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2014/01/05.pdf>. [cit. 2023-12-11].

EAU Guidelines (2023). Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan 2023. ISBN 978-94-92671-19-6.

EPSTEIN, Jonathan I., Lars EGEVAD, Mahul B. AMIN, Brett DELAHUNT, John R. SRIGLEY et al. (2016). *The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System*. *The American Journal of Surgical Pathology*. Online. 2., vol. 40, no. 2, s. 244–252. ISSN 1532-0979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>. [cit. 2023-08-31].

FAN, Yu-Hua, Po-Hsun PAN, Wei-Ming CHENG, Hsin-Kai WANG, Shu-Huei SHEN et al. (2021). *The Prostate Health Index aids multi-parametric MRI in diagnosing significant prostate cancer*. *Scientific Reports*. Online. 5.3., vol. 11, s. 1286. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78428-6>. [cit. 2023-05-26].

FERDA, Jiří, Eva FERDOVÁ, Jan PERNICKÝ, Marika LOOSEOVÁ, Martina ODVODY et al. (2021). *Zobrazení karcinomu prostaty pomocí PET/CT a PET/MR s podáním 68Ga-PSMA-11*. Česká radiologie. Online. vol. 75, no. 1, s. 31–44. ISSN 1210-7883. <http://www.cesradiol.cz/detail.php?stat=749>. [cit. 2023-06-2].

FILELLA, Xavier, Juan ALCOVER, Rafael MOLINA, Nuria GIMENEZ, Alfredo RODRÍGUES et al. (1995). *Clinical usefulness of free PSA fraction as an indicator of prostate cancer*. International Journal of Cancer. Online. vol. 63, no. 6, s. 780–784. ISSN 1097-0215. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910630605>. [cit. 2023-05-09].

FILELLA, Xavier and Nuria GIMENEZ (2013). *Evaluation of  $[-2]$  proPSA and Prostate Health Index ( $\phi$ ) for the detection of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Online. vol. 51, no. 4, s. 729–739. ISSN 1437-4331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0410>. [cit. 2023-08-22].

FLEMING, Richard, Craig FAIRBAIRN, Catherine BLANEY, Dorothy LUCAS, Marco GAUDOIN et al. (2013). *Stability of AMH measurement in blood and avoidance of proteolytic changes*. Reproductive BioMedicine Online. Online. 1.2., vol. 26, no. 2, s. 130–132. ISSN 1472-6483. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.11.005>. [cit. 2023-05-05].

FN MOTOL. *Preanalytická příručka*. Ústav lékařské chemie a klinické biochemie. Online. 2020. Dostupné z: <https://www.fnmotol.cz/wp-content/uploads/preanalyticka-prirucka-2020.pdf>. [cit. 2024-02-05].

FN PLZEŇ. *Laboratorní příručka OID*. Směrnice. Online. 2022. Dostupné z: [https://oid.fnplzen.cz/sites//users/oid/sme\\_8\\_002\\_0.pdf](https://oid.fnplzen.cz/sites//users/oid/sme_8_002_0.pdf). [cit. 2024-02-05].

FN PLZEŇ. *Laboratorní příručka ÚKBH FN Plzeň*. Směrnice SME/8/003/14. Online. 2023. Dostupné z: [SME\\_8\\_003\\_07 \(fnplzen.cz\)](https://sme_8_003_07(fnplzen.cz)). [cit. 2024-02-05].

FORDE, J. C., O. BLAKE, V. E. CROWLEY and T. H. LYNCH (2016). *Stability and accuracy of total and free PSA values in samples stored at room temperature*. Irish Journal of Medical Science (1971 -). Online. 1.11., vol. 185, no. 4, s. 989–991. ISSN 1863-4362. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11845-015-1364-8>. [cit. 2023-07-18].

FREEMAN, Ellen W., Mary D. SAMMEL, Hui LIN, David W. BOORMAN and Clarisa R. GRACIA (2012). *Contribution of the rate of change of antimüllerian hormone in estimating time to menopause for late reproductive-age women*. Fertility and Sterility. Online. 1.11., vol. 98, no. 5, s. 1254-1259.e2. ISSN 0015-0282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1139>. [cit. 2023-05-19].

FREOUR, Thomas, Damien MASSON, Lionel DESSOLLE, Dalila ALLAOUA, Thomas DEJOIE et al. (2012). *Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen*. Archives of Gynecology and Obstetrics. Online. 1.4., vol. 285, no. 4, s. 1177–1182. ISSN 1432-0711. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00404-011-2172-7>. [cit. 2023-07-21].

FUCHSOVÁ, Radka, Milan HORA, Olga DOLEJŠOVÁ and Ondřej TOPOLČAN (2014). *Biomarkery v diagnostice karcinomu prostaty*. Online. ISBN 978-80-263 -0821-8.

Dostupné z: [https://oid.fnplzen.cz/sites//Biomarkery\\_v\\_dianagnostice\\_karcinomu\\_prostaty\\_0.pdf](https://oid.fnplzen.cz/sites//Biomarkery_v_dianagnostice_karcinomu_prostaty_0.pdf). [cit. 2023-10-30].

FUCHSOVÁ, Radka, Ondřej TOPOLČAN, Jiří KLEČKA, Jindra VRZALOVÁ, Milan HORA et al. (2013). *Stanovení sérových markerů v diferenciální diagnostice časného karcinomu prostaty (pilotní studie)*. Online. Klinická biochemie a metabolismus. 22.11., vol. 21, no. 1, s. 21–24. <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2013/2013-1/KBM-1-2013-Fuchsova-21.pdf>. [cit. 2023-05-09].

FUCHSOVA, Radka, Ondrej TOPOLCAN, Jindra WINDRICOVA, Milan HORA, Olga DOLEJSOVA et al. (2015). PHI in the Early Detection of Prostate Cancer. *Anticancer Research*. B.m.: International Institute of Anticancer Research, 1.9., vol. 35, no. 9, s. 4855–4857. ISSN 0250-7005, 1791-7530. PMID: 26254378. [cit. 2023-05-12].

FUENTES, Ariel, Alex MUÑOZ, Ricardo POMMER, Begoña ARGÜELLO, Andrea GALLEGUILLOS et al. (2012). *Decreased anti-Müllerian hormone concentration in follicular fluid of female smokers undergoing artificial reproductive techniques*. Chemosphere. Online. 1.7., vol. 88, no. 4, s. 403–406. ISSN 0045-6535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.054>. [cit. 2023-07-21].

GIONA, Simone (2021). *The Epidemiology of Prostate Cancer*. Prostate Cancer. Online. 27.5., ISBN 978-0-645-00175-4. Dostupné z: <https://doi.org/10.36255/exonpublications.prostatecancer.epidemiology.2021>. [cit. 2023-05-19].

GORKEM, Umit, Ferit Kerim KUCUKLER, Cihan TOGRUL and Tayfun GUNGOR (2017). *Anti-Müllerian hormone exhibits a great variation in infertile women with different ovarian reserve patterns*. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology. Online. vol. 57, no. 4, s. 464–468. ISSN 1479-828X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ajo.12625>. [cit. 2023-05-05].

GREPL, Michal (2010). *Radikální prostatektomie*. Onkologie. Online. 1.5., vol. 4, no 2, s. 72-74. ISSN 18024475. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/02/04.pdf>. [cit. 2023-05-19].

GRINSPON, Romina P., Silvia GOTTLIEB, Patricia BEDECARRÁS and Rodolfo A. REY (2018). *Anti-Müllerian Hormone and Testicular Function in Prepubertal Boys With Cryptorchidism*. *Frontiers in Endocrinology*. Online. 25.4., vol. 9, s. 182. ISSN 1664-2392. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00182>. [cit. 2023-04-28].

GRINSPON, Romina P. and Rodolfo A. REY (2010). *Anti-Müllerian Hormone and Sertoli Cell Function in Paediatric Male Hypogonadism*. *Hormone Research in Paediatrics*. Online. 9.2., vol. 73, no. 2, s. 81–92. ISSN 1663-2818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000277140>. [cit. 2023-05-19].

GROOME, Nigel Patrick, Mark CRANFIELD, Axel P. N. THEMME, Gopal V. SAVJANI, Nassau BAY et al. (2011). *Immunological assay and antibodies for anti-müllerian hormone*. Online. US7897350B2. 1.3. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US7897350B2/en>. [cit. 2023-10-04].

HARITON, Eduardo, Talia N. SHIRAZI, Nataki C. DOUGLAS, Avner HERSHLAG and Sharon F. BRIGGS (2021). *Anti-Müllerian hormone levels among contraceptive users: evidence from a cross-sectional cohort of 27,125 individuals*. American Journal of Obstetrics and Gynecology. Online. 1.11., vol. 225, no. 5, s. 515.e1-515.e10. ISSN 0002-9378. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.06.052>. [cit. 2023-05-05].

HAYASHI, M., H. SHIMA, K. HAYASHI, R. L. TRELSTAD, P. K. DONAHOE et al. (1984). *Immunocytochemical localization of Mullerian inhibiting substance in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in Sertoli cells of the neonatal calf testis using a monoclonal antibody*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society. Online. 6., vol. 32, no. 6, s. 649–654. ISSN 0022-1554. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/32.6.6373916>. [cit. 2023-08-16].

HEDAYATI, Mehdi, S. Adeleh RAZAVI, Seti BOROORMAND and Sima KHERADMAND KIA (2020). *The impact of pre-analytical variations on biochemical analytes stability: A systematic review*. Journal of Clinical Laboratory Analysis. Online. 12., vol. 34, no. 12, s. e23551. ISSN 1098-2825. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.23551>. [cit. 2023-05-04].

HORI, Satoshi, Jean-Sebastien BLANCHET and John MCLOUGHLIN (2013). *From prostate-specific antigen (PSA) to precursor PSA (proPSA) isoforms: a review of the emerging role of proPSAs in the detection and management of early prostate cancer*. BJU International. Online. vol. 112, no. 6, s. 717–728. ISSN 1464-410X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11329.x>. [cit. 2023-05-09].

HOU, Guang-Dong, Yu ZHENG, Wan-Xiang ZHENG, Ming GAO, Lei ZHANG et al. (2020). *A novel nomogram predicting the risk of positive biopsy for patients in the diagnostic gray area of prostate cancer*. Scientific Reports. Online. 19.10., vol. 10, no. 1, s. 17675. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74703-8>. [cit. 2023-09-26].

HRADIL, David, Vladimír ŠTUDENT jr., Milan KRÁL and Vladimír ŠTUDENT (2014). *Diagnostika a staging karcinomu prostaty*. Onkologie. Online. 27.2., vol. 8, no. 1, s. 15-18. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2014/01/04.pdf>. [cit. 2023-08-24].

HUDSON, Peter L., Irene DOUGAS, Patricia K. DONAHOE, Richard L. CATE, James EPSTEIN et al. (1990). *An Immunoassay to Detect Human Mullerian Inhibiting Substance in Males and Females during Normal Development\**. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. Online. 1.1., vol. 70, no. 1, s. 16–22. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/jcem-70-1-16>. [cit. 2023-07-21].

IGAWA, Tsukasa, Kosuke TAKEHARA, Toru ONITA, Kazuto ITO and Hideki SAKAI (2014). *Stability of [-2]Pro-PSA in Whole Blood and Serum: Analysis for Optimal Measurement Conditions*. Journal of Clinical Laboratory Analysis. Online. 27.2., vol. 28, no. 4, s. 315–319. ISSN 0887-8013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.21687>. [cit. 2023-05-09].

ILYIN, Sergey E., Stanley M. BELKOWSKI and Carlos R. PLATA-SALAMÁN (2004). *Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches*. Trends in

Biotechnology. Online. 8., vol. 22, no. 8, s. 411–416. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.06.005>. [cit. 2023-08-16].

ISBER. *SOP for sample stability test*. Online. Vancouver, Canada: International Society for Biological and Environmental Repositories © 2015 ISBER. Dostupné z: <https://cdn.ymaws.com/www.isber.org/resource/resmgr/documents/STABCALC-SOP.pdf>. [cit. 2023-05-02].

JANŮ, Jiří, Jiří LADMAN, Hana LÁSKOVÁ, Martina NOVOTNÁ and Otakar ŠTANC (2022). *Léčba obtíží souvisejících se zvětšenou prostatou*. Česká urologická společnost ČLS JEP. Online. Dostupné z: <https://www.cus.cz/pro-pacienty/diagnozy/lecba-obtizi-souvisejicich-se-zvetšenou-prostatou/>. [cit. 2023-08-24].

JOPLING, Helen, Allen YATES, Nicholas BURGOYNE, Katharine HAYDEN, Christopher CHALONER et al. (2018). *Paediatric Anti-Müllerian Hormone measurement: Male and female reference intervals established using the automated Beckman Coulter Access AMH assay*. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism*. Online. 10., vol. 1, no. 4, s. e00021. ISSN 23989238. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/edm2.21>. [cit. 2023-04-28].

JOSSO, Nathalie, Laurence LEGEAI, Maguelone G. FOREST, Jean-Louis CHAUSSAIN and Raja BRAUNER (1990). *An Enzyme Linked Immunoassay for Anti-Müllerian Hormone: A New Tool for the Evaluation of Testicular Function in Infants and Children*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Online. 1.1., vol. 70, no. 1, s. 23–27. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/jcem-70-1-23>. [cit. 2023-07-21].

JOST, Alfréd (1953). *Problems of fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones*. vol. 8, s. 379–418. [cit. 2023-04-28].

JUNG, K., U. ELGETI, M. LEIN, B. BRUX and P. SINHA et al. (2000). Ratio of free or complexed prostate-specific antigen (PSA) to total PSA: which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? *Clinical Chemistry*. 1., vol. 46, no. 1, s. 55–62. ISSN 0009-9147. PMID: 10620572. [cit. 2023-05-09].

KANAKATTI SHANKAR, R., T. DOWLUT-MC ELROY, A. DAUBER and V. GOMEZ-LOBO (2022). *Clinical Utility of Anti-Müllerian Hormone in Pediatrics*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Online. 18.1. vol. 107, s. 309–323. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab687>. [cit. 2023-04-28].

KARLÍKOVÁ, Marie (2018). *Nádorové markery*. PO>STUDIUM. Online. 9. 2. 2018. ISSN 1803-8999. Dostupné z: <https://postudium.cz/course/view.php?id=452>. [cit. 2023-07-19].

KATOLICKÁ, Jana (2013). *Bisfosfonáty u urologických malignit*. *Onkologie*. Online. 1.2., vol. 7, no 1, s. 18–21. ISSN 18024475. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2013/01/05.pdf>. [cit. 2023-12-11].

KAUŠITZ, Juraj, Čestmír ALTANER, Elena BOLJEŠIKOVÁ and Stanislav ŠPÁNIK (2003). *Onkológia*. 1st ed. Bratislava: VEDA. ISBN 80-224-0711-9.

KHAN, Masood A., Alan W. PARTIN, Harry G. RITTENHOUSE, Stephen D. MIKOLAJCZYK, Lori J. SOKOLL et al. (2003). *Evaluation of Prostate Specific Antigen for Early Detection of Prostate Cancer in Men With a Total Prostate Specific Antigen Range of 4.0 to 10.0 Ng/ML*. *Journal of Urology*. Online. 9., vol. 170, no. 3, s. 723–726. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000086940.10392.93>. [cit. 2023-05-09].

KINKOROVÁ, Judita (2019). *Biobanky - novinky ze světa: Letter to the editors: Biobanks - news from the world*. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. Online. B.m.: Czech Medical Association of JE Purkyne, 12., vol. 27, no. 4, s. 193–195. ISSN 12107921. Dostupné z: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=asn&AN=143018113&site=ehost-live>. [cit. 2023-05-02].

KINKOROVÁ, Judita and Ondřej TOPOLČAN (2016). *Biobanky – evropská infrastruktura*. *Časopis lékařů českých*. Online. vol. 155, no. 3, s. 44–46. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2016-3/biobanky-evropska-infrastruktura-58135/download?hl=cs>. [cit. 2023-05-02].

KLEČKA, Jiří and Milan HORA (2007). *Benigní hyperplazie prostaty a současné trendy v léčbě*. *Urologie pro praxi*. Online. vol. 3, s. 120–126. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2007/03/04.pdf>. [cit. 2023-08-22].

KLOTZ, Laurence, Danny VESPRINI, Perakaa SETHUKAVALAN, Vibhuti JETHAVA, Liying ZHANG et al. (2015). *Long-term follow-up of a large active surveillance cohort of patients with prostate cancer*. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. Online. 20.1., vol. 33, no. 3, s. 272–277. ISSN 1527-7755. Dostupné z: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.1192>. [cit. 2023-08-24].

KREJČÍ, D., J. MUŽÍK, L. DUŠEK (2023). *Současné epidemiologické trendy novotvarů v České republice*. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Online. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008447/novotvary2019-2021.pdf>. [cit. 2024-03-04].

KUCERA, Radek, Ladislav PECEN, Ondřej TOPOLČAN, Anshu R. DAHAL, Vincenzo COSTIGLIOLA et al. (2020). *Prostate cancer management: long-term beliefs, epidemic developments in the early twenty-first century and 3PM dimensional solutions*. *EPMA Journal*. Online. 9., vol. 11, no. 3, s. 399–418. ISSN 1878-5077, 1878-5085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13167-020-00214-1>. [cit. 2023-04-28].

KUČERA, Radek, Ondřej TOPOLČAN, Taťána RUMPÍKOVÁ, David RUMPÍK and Jiří DOSTÁL (2013). *Stanovení anti-Müllerova hormonu u žen*. *Česká Gynekologie ČLS JEP*, vol. 78, no. 3, s. 282–288. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2013-3/stanoveni-anti-mullerova-hormonu-u-zen-40980>. [cit. 2023-04-28].

KUMAR, Ajay, Bhanu KALRA, Amita PATEL, Lauren McDAVID and William E. ROUDEBUSH (2010). *Development of a second generation anti-Müllerian hormone (AMH) ELISA*. *Journal of immunological methods*. Online. 1.10., vol. 362, nos. 1–2, s. 51–59. ISSN 1872-7905. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.08.011>. [cit. 2023-05-05].

KURFÜRSTOVÁ, Daniela and Milan KRÁL (2013). Adenokarcinom prostaty a hodnocení stupně jeho diferenciaci: změny v hodnocení Gleasonova skóre od jeho vzniku po současnost a jeho význam pro praxi patologa a urologa. *Urologie pro praxi*. Online. 1.4., vol. 14, no. 4, s. 157–159. ISSN 1803-5299. Dostupné z: <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2013/04/03.pdf>. [cit. 2023-05-05].

LA MARCA, A., F.J. BROEKMANS, A. VOLPE, B.C. FAUSER and N.S. MACKLON (2009). *Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know?* *Human Reproduction*. Online. 1.9., vol. 24, no. 9, s. 2264–2275. ISSN 0268-1161, 1460-2350. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/humrep/dep210>. [cit. 2023-04-28].

LA MARCA, A. and A. VOLPE (2006). *Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool?* *Clinical Endocrinology*. Online. 6.3., vol. 64, no. 6, s. 603–610. ISSN 1365-2265. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02533.x>. [cit. 2023-05-19].

LA MARCA, Antonio, Valentina GRISENDI and Georg GRIESINGER (2013). *How Much Does AMH Really Vary in Normal Women?* *International Journal of Endocrinology*. Online. 13.10., vol. 2013, s. 959487. ISSN 1687-8337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/959487>. [cit. 2023-05-05].

LAMY, P.J., Y. ALLORY, A.S. GAUCHEZ, B. ASSELAIN, P. BEUZÉBOC, B. ASSELAIN, P. BEUZÉBOC et al. (2018). *Prognostic Biomarkers Used for Localised Prostate Cancer Management: A Systematic Review*. *European Urology Focus*. Online. 1.12., vol. 4, no. 6, s. 790–803. ISSN 2405-4569. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.02.017>. [cit. 2023-11-20].

LANDERSOE, Selma Kloeve, Elisabeth Clare LARSEN, Julie Lyng FORMAN, Kathrine Birch PETERSEN, Mie Stougaard KROMAN et al. (2020). *Ovarian reserve markers and endocrine profile during oral contraception: Is there a link between the degree of ovarian suppression and AMH?* *Gynecological Endocrinology*. Online. B.m.: Taylor & Francis, 1.12., vol. 36, no. 12, s. 1090–1095. ISSN 0951-3590. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/09513590.2020.1756250>. [cit. 2023-05-05].

LEDGER, William L. (2010). *Clinical Utility of Measurement of Anti-Müllerian Hormone in Reproductive Endocrinology*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Online. 1.12., vol. 95, no. 12, s. 5144–5154. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0701>. [cit. 2023-08-18].

LEE, Jae-Eun, Shine Young KIM and So-Youn SHIN (2015). *Effect of Repeated Freezing and Thawing on Biomarker Stability in Plasma and Serum Samples*. *Osong Public Health and Research Perspectives*. Online. 12., vol. 6, no. 6, s. 357–362. ISSN 2210-9099. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.005>. [cit. 2023-05-05].

LEE, Jun Ho and Joan MASSAGUÉ (2022). *TGF- $\beta$  in developmental and fibrogenic EMTs*. *Seminars in Cancer Biology*. Online. 1.11., vol. 86, s. 136–145. ISSN 1044-579X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.09.004>. [cit. 2023-08-16].

LEE, Mary M, Madhusmita MISRA, Patricia K DONAHOE and David T MACLAUGHLIN (2003). *MIS/AMH in the assessment of cryptorchidism and intersex conditions*. *Molecular*

and Cellular Endocrinology. Online. 15.12., vol. 211, no. 1, First International Meeting on Anti-Müllerian Hormone/Müllerian Inhibiting Substance, s. 91–98. ISSN 0303-7207. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.09.014>. [cit. 2023-06-01].

LI, Hang Wun Raymond, Ching Yin Grace WONG, William Shu Biu YEUNG, Pak Chung HOA and Ernest Hung Yu NG (2011). *Serum anti-müllerian hormone level is not altered in women using hormonal contraceptives*. Contraception. Online. 1.6., vol. 83, no. 6, s. 582–585. ISSN 0010-7824. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2010.09.007>. [cit. 2023-08-21].

LIM, Jue Tao, Yue Qian TAN, Linda VALERI, Jingyi LEE, Per Poh GEOK et al. (2019). *Association between serum heavy metals and prostate cancer risk – A multiple metal analysis*. Environment International. Online. 1.11., vol. 132, s. 105109. ISSN 0160-4120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105109>. [cit. 2023-08-23].

LINDHARDT JOHANSEN, Marie, Casper P. HAGEN, Trine Holm JOHANNSEN, Katharina M. MAIN, Jean-Yves PICARD et al. (2013). *Anti-Müllerian Hormone and Its Clinical Use in Pediatrics with Special Emphasis on Disorders of Sex Development*. International Journal of Endocrinology. Online. vol. 2013, s. 198698. ISSN 1687-8337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/198698>. [cit. 2023-08-21].

LV, Ping-Ping, Min JIN, Jin-Peng RAO, Jian CHEN, Li-Quan WANG et al. (2020). *Role of anti-Müllerian hormone and testosterone in follicular growth: a cross-sectional study*. BMC Endocrine Disorders. Online. 8.7., vol. 20, no. 1, s. 101. ISSN 1472-6823. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12902-020-00569-6>. [cit. 2023-07-24].

MAGNUSSON, Å, G OLERÖD, A THURIN-KJELLBERG and C BERGH (2017). *The correlation between AMH assays differs depending on actual AMH levels*. Human Reproduction Open. Online. 8.12., vol. 2017, no. 4, s. hox026. ISSN 2399-3529. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/hropen/hox026>. [cit. 2023-08-21].

MALM, Johan, Thomas E FEHNIGER, Pia DANMYR, Ákos VÉGVÁRI, Charlotte WELINDER et al. (2013). *Standardization developments for large scale biobanks in smoking related diseases - a model system for blood sample processing and storage*. Translational Respiratory Medicine. Online. 30.8., vol. 1, s. 14. ISSN 2213-0802. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/2213-0802-1-14>. [cit. 2023-05-05].

MAREK, Dan and Štěpán MACHAČ (2005). *Ovariální hyperstimulační syndrom - soubor interních komplikací u gynekologických pacientek*. Interní medicína pro praxi. Online. 13.12., vol. 5, no. 8, s. 389–393. ISSN 12127299, 18035256. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2003/08/03.pdf>. [cit. 2023-08-18].

MARKO-VARGA, György, Ákos VÉGVÁRI, Charlotte WELINDER, Henrik LINDBERG, Melinda REZELI et al. (2012). *Standardization and utilization of biobank resources in clinical protein science with examples of emerging applications*. Journal of proteome research. Online. 1.11., vol. 11, no. 11, s. 5124–5134. ISSN 1535-3907. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/pr300185k>. [cit. 2023-05-05].

MATOUŠ, Bohuslav, Eva BUBNOVÁ, Alena BUDĚŠÍNSKÁ et al. (2010). *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-702-8.



MAXEINER, A., E. KILIC, J. MATALON, F. FRIEDERSDORFF, K. MILLER et al. (2017). *The prostate health index PHI predicts oncological outcome and biochemical recurrence after radical prostatectomy - analysis in 437 patients*. *Oncotarget*. Online. 27.4., vol. 8, no. 45, s. 79279-79288. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17476>. [cit. 2023-11-20].

MC DONALD, A. G., S. BOYCE, K. F. TIPTON (2009). *ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list*. *Nucleic Acids Research*. Online. 1.1., vol. 37, no. 1, s. D593–D597, [ISSN 0305-1048](https://doi.org/10.1093/nar/gkn582). Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn582>. [cit. 2023-11-20].

MELADO, Laura, Barbara LAWRENZ, Junard SIBAL, Emmanuel ABU, Carol COUGHLAN et al. (2018). *Anti-müllerian Hormone During Natural Cycle Presents Significant Intra and Intercycle Variations When Measured With Fully Automated Assay*. *Frontiers in Endocrinology*. Online. 27.11., vol. 9, s. 686. ISSN 1664-2392. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00686>. [cit. 2023-05-05].

MEZYNSKA, Magdalena and Malgorzata M. BRZÓSKA (2018). *Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies*. *Environmental Science and Pollution Research*. Online. 1.2., vol. 25, no. 4, s. 3211–3232. ISSN 1614-7499. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0827-z>. [cit. 2023-08-23].

MIKOLAJCZYK, S. D., L. S. MILLAR, T. J. WANG, H. G. RITTENHOUSE, L. S. MARKS et al. (2000). *A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue*. *Cancer Research*. Online. 1.2., vol. 60, no. 3, s. 756–759. ISSN 0008-5472. PMID: 10676664. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/60/3/756/506991/A-Precursor-Form-of-Prostate-specific-Antigen-Is>. [cit. 2023-05-09].

MIKOLAJCZYK, Stephen D., Leonard S. MARKS, Alan W. PARTIN and Harry G. RITTENHOUSE (2002). *Free prostate-specific antigen in serum is becoming more complex*. *Urology*. Online. 1.6., vol. 59, no. 6, s. 797–802. ISSN 0090-4295. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(01\)01605-3](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(01)01605-3). [cit. 2023-05-19].

MOOLHUIJSEN, Loes M. E. and Jenny A. VISSER (2020). *Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Online. 8.8., vol. 105, no. 11, s. 3361–3373. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa513>. [cit. 2023-05-05].

MOTTET, Nicolas, Roderick C. N. van den BERGH, Eric BRIERS, Thomas VAN DEN BROECK, Marcus G. CUMBERBATCH et al. (2021). *EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Scenning, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent*. *European Urology*. Online. 2., vol. 79, no. 2, s. 243-262. ISSN 1873-7560. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.09.042>. [cit. 2023-05-24].

NARAYANAN, Sheshadri (2000). *The Preanalytic Phase: An Important Component of Laboratory Medicine*. *American Journal of Clinical Pathology*. Online. 1.3., vol. 113,

no. 3, s. 429–452. ISSN 0002-9173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1309/C0NM-Q7R0-LL2E-B3UY>. [cit. 2023-05-05].

NELSON, Scott M., Per LARSSON, Bernadette M. J. L. MANNAERTS, Anders N. ANDERSEN, Bart C. J. M. FAUSER (2019). *Anti-Müllerian hormone variability and its implications for the number of oocytes retrieved following individualized dosing with follitropin delta*. *Clinical Endocrinology*. Online. 5., vol. 90, no. 5, s. 719–726. ISSN 0300-0664, 1365-2265. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cen.13956>. [cit. 2023-04-28].

NEZBEDA, Pavel (2018). *Kurz: Laboratorní diagnostický proces. PO>STUDIUM*. Online. Dostupné z: <https://postudium.cz/course/view.php?id=421>. ISSN 1803-8999. [cit. 2023-05-12].

OVERBEEK, Annelies, Frank J. BROEKMANS, Wouter J. HEHENKAMP, Marlies E. WIJDEVELD, Jeroen van DISSELDORP et al. (2012). *Intra-cycle fluctuations of anti-Müllerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis*. *Reproductive BioMedicine Online*. Online. 1.6., vol. 24, no. 6, s. 664–669. ISSN 1472-6483. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.023>. [cit. 2023-05-05].

PANKHURST, Michael W. and Ian S. MCLENNAN (2013). *Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Müllerian hormone and a complex of the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal peptides*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. Online. B.m.: American Physiological Society, 15.11., vol. 305, no. 10, s. E1241–E1247. ISSN 0193-1849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00395.2013>. [cit. 2023-05-05].

PAPALEO, E., S. ZAFFAGNINI, M. MUNARETTO, V. S. VANNIA, G. REBONATO et al. (2016). *Clinical application of a nomogram based on age, serum FSH and AMH to select the FSH starting dose in IVF/ICSI cycles: a retrospective two-centres study*. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. Online. 26.10., vol. 207, s. 94-99. ISSN 0301-2115. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.10.021>. [cit. 2023-11-20].

PAPSIDERO, L. D., M. C. WANG, L. A. VALENZUELA, G. P. MURPHY, T. M. CHU (1980). *A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients*. *Cancer Research*. 7., vol. 40, no. 7, s. 2428–2432. ISSN 0008-5472. PMID: 7388802. [cit. 2023-05-19].

PARDO, Larissa A., Laura E. BEANE FREEMAN, Catherine C. LERRO, Gabriella ANDREOTTI, Jonathan N. HOFMANN et al. (2020). *Pesticide exposure and risk of aggressive prostate cancer among private pesticide applicators*. *Environmental Health*. Online. 5.3., vol. 19, s. 30. ISSN 1476-069X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00583-0>. [cit. 2023-08-23].

PAWLIK-SOBECKA, Lilla, Katarzyna SOŁKIEWICZ, Izabela KOKOT, Aleksandra KIRAGA, Sylwia PLACZKOWSKA et al. (2020). *The Influence of Serum Sample Storage Conditions on Selected Laboratory Parameters Related to Oxidative Stress: A Preliminary Study*. *Diagnostics*. Online. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1., vol. 10, no. 1, s. 51. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010051>. [cit. 2023-10-30].

PEARSON, K., M. LONG, J. PRASAD, Y. Y. WU and M. BONIFACIO (2016). *Assessment of the Access AMH assay as an automated, high-performance replacement for the AMH Generation II manual ELISA*. Reproductive Biology and Endocrinology. Online. 16.2., vol. 14, no. 8., s. 1-9. ISSN 1477-7827. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0143-3>. [cit. 2024-01-29].

PICARD, J. Y., R. BENAROUS, D. GUERRIER, N. JOSSO and A. KAHN et al. (1986). *Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Online. 8., vol. 83, no. 15, s. 5464–5468. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.15.5464>. [cit. 2023-05-02].

PICARD, J. Y. and N. JOSSO (1984). *Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor*. Molecular and Cellular Endocrinology. Online. 1., vol. 34, no. 1, s. 23–29. ISSN 0303-7207. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(84\)90155-2](https://doi.org/10.1016/0303-7207(84)90155-2). [cit. 2023-04-28].

PIIRONEN, Timo, Kim PETTERSSON, Mikko SUONPÄÄ, Ulf-Hakan STENMAN, Joseph E. OESTERLING et al. (1996). *In vitro stability of free prostate-specific antigen (PSA) and prostate-specific antigen (PSA) complexed to  $\alpha$ 1-antichymotrypsin in blood samples*. Urology. Online. 1.12., vol. 48, nos. 6, Supplement 1, s. 81–87. ISSN 0090-4295. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(96\)00616-4](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(96)00616-4). [cit. 2023-05-18].

PLEVOVÁ, Pavlína and Hedvika GERŽOVÁ (2019). *Vzácné pediatrické ovariální tumory a jejich genetické příčiny*. Klinická onkologie. Online. 8.15., vol. 32, Supplement 2, s. 79–91. ISSN 18025307. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2019S79>. [cit. 2023-08-21].

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (2008). *Ovarian hyperstimulation syndrome*. Fertility and Sterility. Online. 11, no. 90, Supplement 5, s. 188–93. ISSN 1556-5653. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.034>. [cit. 2023-08-21].

RACEK, Jaroslav, Daniel RAJDL, Pavel BROŽ, Roman CIBULKA, Jitka ŠLECHTOVÁ (2021). *Klinická biochemie*. 3rd ed. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-545-0.

RANGANATHAN, Priya, C. S. PRAMESH and Marc BUYSE (2015). *Common pitfalls in statistical analysis: “P” values, statistical significance and confidence intervals*. Perspectives in Clinical Research. Online. 6., vol. 6, no. 2, s. 116-117. ISSN 2229-3485. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/2229-3485.154016>. [cit. 2024-02-02].

RANGANATHAN, Priya, C. S. PRAMESH and Marc BUYSE (2015). *Common pitfalls in statistical analysis: Clinical versus statistical significance*. Perspectives in Clinical Research. Online. 9., vol. 6, no. 3, s. 169-170. ISSN 2229-3485. Dostupné z: <https://doi.org/10.4103/2229-3485.159943>. [cit. 2024-02-01].

REY, Rodolfo, Céline LUKAS-CROISIER, Celina LASALA and Patricia BEDECARRÁS (2003). *AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation*. Molecular and Cellular Endocrinology. Online. 12., vol. 211, nos. 1–2, s. 21–31. ISSN 03037207. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.09.007>. [cit. 2023-04-28].

ROMERO OTERO, Javier, Borja GARCIA GOMEZ, Felix CAMPOS JUANATEY and Karim A. TOUIJER (2014). *Prostate cancer biomarkers: An update*. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. Online. 1.4., vol. 32, no. 3, s. 252–260. ISSN 1078-1439. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.09.017>. [cit. 2023-05-26].

RUDNICKA, Ewa, Michał KUNICKI, Anna CALIK-KSEPKA, Katarzyna SUCHTA, Anna DUSZEWSKA et al. (2021). *Anti-Müllerian Hormone in Pathogenesis, Diagnostic and Treatment of PCOS*. International Journal of Molecular Sciences. Online. 19.11., vol. 22, no. 22, s. 12507. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222212507>. [cit. 2023-04-28].

RUŠAROVÁ, Nikol, Marie BARTOUŠKOVÁ and Hana ŠTUDENTOVÁ (2019). *Hormonálně senzitivní karcinom prostaty*. Česká urologie. Online. 1.4., vol. 23, no. 4, s. 309-315. Dostupné z: <https://www.czechurol.cz/pdfs/cur/2019/04/04.pdf>. [cit. 2023-12-11].

SAINI, Sharanjot (2016). *PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers*. Cellular oncology (Dordrecht). Online. 4., vol. 39, no. 2, s. 97–106. ISSN 2211-3428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0268-6>. [cit. 2023-08-22].

SCARAMUZZINO, D. A., K. SCHULTE, B. N. MACK, T. F. SORIANO and H. A. FRITSCHÉ (2007). *Five-year stability study of free and total prostate-specific antigen concentrations in serum specimens collected and stored at -70 degrees C or less*. The International Journal of Biological Markers. Online. vol. 22, no. 3, s. 206–213. ISSN 0393-6155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/172460080702200308>. [cit. 2023-05-19].

SCHOBBER, Philip, Sebastiaan M. BOSSERS and Lothar A. SCHWARTE (2014). *Clinical significance versus statistical significance*. The British Medical Journal. Online. 14.3., vol. 348, g2130. ISSN 1756-1833. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/bmj.g2130>. [cit. 2023-12-05].

SEDLÁČKOVÁ, Hana, Olga DOLEJŠOVÁ, Milan HORA, Jiří FERDA, Ondřej HES et al. (2021). *Prostate Cancer Diagnostic Algorithm as a “Road Map” from the First Stratification of the Patient to the Final Treatment Decision*. Life. Online. 7.4., vol. 11, no. 4, s. 324. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life11040324>. [cit. 2023-05-26].

SEDGWICK, Patrick, Sebastiaan M. BOSSERS and Lothar A. SCHWARTE (2018). *Statistical Significance Versus Clinical Importance of Observed Effect Sizes: What Do P Values and Confidence Intervals Really Represent?* Anesthesia and Analgesia. Online. 15.6., vol. 126, no. 3, s. 1068-1072. ISSN 0003-2999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002798>. [cit. 2023-12-05].

SEMJONOW, Axel, Thomas KÖPKE, Elke ELTZE, Beate PEPPING-SCHEFERS, Hilla BURGEL et al. (2010). *Pre-analytical in-vitro stability of [-2]proPSA in blood and serum*. Clinical Biochemistry. Online. 7., vol. 43, nos. 10–11, s. 926–928. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.04.062>. [cit. 2023-05-09].

SILVA, Mauro S. B. and Paolo GIACOBINI (2021). *New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development*.

Cellular and Molecular Life Sciences. Online. 1., vol. 78, no. 1, s. 1–16. ISSN 1420-682X, 1420-9071. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03576-x>. [cit. 2023-04-28].

SIMANEK, Vaclav, Ondrej TOPOLCAN, Marie KARLIKOVA, Olga DOLEJSOVA, Radka FUCHSOVA et al. (2018). *Stability of total prostate-specific antigen and free prostate-specific antigen after 10 years' storage*. The International Journal of Biological Markers. Online. 11., vol. 33, no. 4, s. 463–466. ISSN 1724-6008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1724600818789414>. [cit. 2023-04-28].

ŠLÍPKA, Jaroslav and Zbyněk TONAR (2020). *Základy embryologie*. 2nd ed. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-4179-9.

SNAPES, E and D. SIMEON-DUBACH (2022). *ISBER Best Practices for Repositories, Moving Toward the Fifth Edition*. Biopreservation and Biobanking. Online. 15.2., vol. 20, no.1, s. 107-108. ISSN 1947-5543. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/bio.2022.29102.ejs>. [cit. 2023-11-13].

SOKOLL, Lori J, Debra J BRUZEK, Renu DUA, Willard DUNN, Phaedre MOHR et al. (2002). *Short-term stability of the molecular forms of prostate-specific antigen and effect on percent complexed prostate-specific antigen and percent free prostate-specific antigen*. Urology. Online. 10., vol. 60, no. 4, s. 24–30. ISSN 00904295. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(02\)01723-5](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(02)01723-5). [cit. 2023-07-18].

SOWERS, MaryFran R., Daniel MCCONNELL, Matheos YOSEF, Mary L. JANNAUSCH, Sioban D. HARLOW et al. (2010). *Relating smoking, obesity, insulin resistance, and ovarian biomarker changes to the final menstrual period*. Annals of the New York Academy of Sciences. Online. 1., vol. 1204, no. 1, s. 95–103. ISSN 1749-6632. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05523.x>. [cit. 2023-07-21].

ŠAFARČÍK, Kristián, Vladimír BARTOŠ and Marie KARLÍKOVÁ (2018). *Principy imunoanalytických metod. PO>STUDIUM*. Online. 8.2. ISSN 1803-8999. Dostupné z: <https://postudium.cz/mod/book/view.php?id=5374>. [cit. 2023-11-10].

TEEDE, H., M. MISSO, E. C. TASSONE, D. DEWAILLY, E. H. NG et al. (2019). *Anti-müllerian hormone in PCOS: A review informing international guidelines*. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. Online. B.m.: Elsevier, 1.7., vol. 30, no. 7, s. 467-478. ISSN 1879-3061. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.04.006>. [cit. 2023-08-21].

TRAN, Dien and Nathalie JOSSO (1982). *Localization of Anti-Müllerian Hormone in the Rough Endoplasmic Reticulum of the Developing Bovine Sertoli Cell Using Immunocytochemistry with a Monoclonal Antibody*. Endocrinology. Online. 1.11., vol. 111, no. 5, s. 1562–1567. ISSN 0013-7227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/endo-111-5-1562>. [cit. 2023-08-16].

TSE, Lap Ah., Priscilla Ming Yi LEE, Wing Ming HO, Augustine Tsan LAM, Man Kei LEE et al. (2017). *Bisphenol A and other environmental risk factors for prostate cancer in Hong Kong*. Environment International. Online. 1.10., vol. 107, s. 1–7. ISSN 0160-4120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.012>. [cit. 2023-08-23].

VAN OMMEN, Gert-Jan B, Outi TÖRNWALL, Christian BRÉCHOT, Georges DAGHER, Joakim GALLI et al. (2015). *BBMRI-ERIC as a resource for pharmaceutical and life science industries: the development of biobank-based Expert Centres*. European Journal of Human Genetics. Online. 7., vol. 23, no. 7, s. 893–900. ISSN 1018-4813. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.235>. [cit. 2023-08-15].

VAŠE LABORATOŘE (2019). *Preanalytická fáze – manuál pro odběry primárních vzorků*. Online. Dostupné z: <https://www.vaselaboratore.cz/preanalyticka-faze-manual-pro-odbery-primarnich-vzorku>. [cit. 2023-05-02].

VIGNATI, G. and L. GIOVANELLI (2007). *Standardization of PSA measures: a reappraisal and an experience with WHO calibration of Beckman Coulter Access Hybritech total and free PSA*. The International Journal of Biological Markers. Online. 10., vol. 22, no. 4, s. 295–301. ISSN 0393-6155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/172460080702200409>. [cit. 2023-11-10].

VRZÁKOVÁ, Radana, Václav ŠIMÁNEK, Ondřej TOPOLČAN, Vladimír VURM, David Slouka et al. (2023). *The Stability of the Anti-Müllerian Hormone in Serum and Plasma Samples under Various Preanalytical Conditions*. Diagnostics. Online. 21.4., vol. 13, no. 8, s. 1501. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081501>. [cit. 2023-05-05].

WANG, M. C., L. A. VALENZUELA, G. P. MURPHY and T. M. CHU (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*. 9., vol. 17, no. 2, s. 159–163. ISSN 0021-0005. [cit. 2023-05-09].

WEENEN, Christien, Joop S.E. LAVEN, Anne R.M. VON BERGH, Mark CRANFIELD, Nigel P.GROOME et al. (2004). *Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment*. Molecular Human Reproduction. Online. 1.2., vol. 10, no. 2, s. 77–83. ISSN 1360-9947. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/molehr/gah015>. [cit. 2023-08-18].

WHO (2019). *WHO International Collaborative Study of the Proposed WHO IS for Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, human, recombinant*. Online. Geneva, Switzerland: World Health Organization. © 2019 WHO. Dostupné z: [WHO/BS/2019.2363 WHO IS for Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone, human, recombinant](https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2019.2363-WHO-IS-for-Mullerian-Inhibiting-Substance-Anti-Mullerian-Hormone-human-recombinant). [cit. 2024-02-19].

WHO (2024). *International Agency for Research on Cancer*. Online. Geneva, Switzerland: World Health Organization. © 2024 WHO. Dostupné z: [Cancer Today \(who.int\)](https://www.who.int/cancer) [cit. 2024-02-19].

WILSON, C. A., N. DI CLEMENTE, C. EHRENFELS, R. B. PEPINSKY, N. JOSSO et al. (1993). *Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily*. Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.). Online. 2., vol. 7, no. 2, s. 247–257. ISSN 0888-8809. Dostupné z: <https://doi.org/10.1210/mend.7.2.8469238>. [cit. 2023-05-02].

WISSING, Marie Louise, Anne Lis MIKKELSEN, Ajay KUMAR, Bhanu KALRA, Susanne Elisabeth PORS et al. (2019). *Associations of different molecular forms of*

*antimüllerian hormone and biomarkers of polycystic ovary syndrome and normal women.* Fertility and Sterility. Online. 1.7., vol. 112, no. 1, s. 149-155.e1. ISSN 0015-0282. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.002>. [cit. 2023-05-05].

ZANINOTTO, M., A. TASINATO, A. PADOAN, G. VECCHIATO, A. PINATO et al. (2012). *An integrated system for monitoring the quality of sample transportation.* Clinical Biochemistry. Online. 6., vol. 45, no. 9, s. 688–690. ISSN 1873-2933. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.02.013>. [cit. 2023-05-04].

ZIMA, Tomáš (2010). *Zásady přípravy pacienta k odběru krve a preanalytická část laboratorního vyšetření.* Interní medicína pro praxi. Online. 15.11., no. 12, vol. 10, s. 490–493. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/10/07.pdf>. [cit. 2023-04-28].

ZIMA, Tomáš (2013). *Laboratorní diagnostika.* 3rd ed. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-062-2.

## 6 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Referenční hodnoty tPSA v séru.....	32
Tabulka 2 - Referenční hodnoty fPSA/tPS v séru.....	33
Tabulka 3 - Referenční hodnoty PHI v séru.....	34
Tabulka 4 - Faktory ovlivňující PCa.....	37
Tabulka 5 - Revidovaný systém klasifikace PCa Grade Groups.....	38
Tabulka 6 - Protokol testování stability AMH u vzorků séra a plazmy.....	43
Tabulka 7 - Protokol testování stability PSA markerů u vzorků séra.....	46
Tabulka 8 - Charakteristika pacientů a výchozí hodnota prostatických markerů (čerstvé vzorky).....	47
Tabulka 9 - Sumární statistiky výsledků testování stability AMH rozmrazováním a zmrazováním ve vzorcích séra a plazmy.....	56
Tabulka 10 - Sumární statistiky výsledků testování stability AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 4 °C.....	58
Tabulka 11 - Sumární statistiky výsledků testování stability AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 22 °C.....	60
Tabulka 12 - Sumární statistiky výsledků testování stability AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných po dobu 30 dnů při -20 °C.....	62
Tabulka 13 - Sumární statistiky výsledků testování stability tPSA a fPSA.....	68
Tabulka 14 - Sumární statistiky výsledků testování stability [-2]proPSA.....	69
Tabulka 15 - Sumární statistiky výsledků testování stability tPSA, fPSA a [-2]proPSA rozmrazováním a zmrazováním.....	70
Tabulka 16 - Sumární statistiky výsledků testování stability tPSA, fPSA a [-2]proPSA při skladování při 4 °C a 22 °C.....	73
Tabulka 17 - Sumární statistiky výsledků poměru fPSA/tPSA.....	79
Tabulka 18 - Sumární statistiky výsledků PHI.....	80
Tabulka 19 - Sumární statistiky výsledků poměru fPSA/tPSA a PHI při testování stability rozmrazováním a zmrazováním.....	81
Tabulka 20 - Sumární statistiky výsledků testování při skladování při 4 °C a 22 °C.....	82



## 7 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Jednotlivé fáze laboratorního vyšetření.....	11
Obrázek 2 - Biosyntéza a processing AMH.....	21
Obrázek 3 - Vývoj folikulů v ovariu, produkce AMH v ovariu a testes.....	23
Obrázek 4 - Sexuální diferenciaci lidského plodu.....	24
Obrázek 5 - Koncentrace AMH v séru u žen ve fertilním věku .....	25
Obrázek 6 - Model působení AMH ve vaječniku.....	26
Obrázek 7 - Biosyntéza a processing PSA.....	30
Obrázek 8 - Formy PSA přítomné v krvi.....	31
Obrázek 9 - Benigní hyperplazie prostaty.....	35
Obrázek 10 - Algoritmus pro diagnostiku karcinomu prostaty.....	39
Obrázek 11 - Klinická stadia karcinomu prostaty.....	41
Obrázek 12 - Standardní operační postup pro testování stability vzorků opakovaným rozmrazováním a zmrazováním.....	44
Obrázek 13 - Standardní operační postup pro testování stability vzorků během skladování při různých teplotách.....	45
Obrázek 14 - Standardní operační postup pro testování stability vzorků během skladování při různých teplotách.....	48
Obrázek 15 - Přístroj na chemiluminiscenční imunoanalýzu - UniCel DxI 800 Access Immunoassay Systém.....	50
Obrázek 16 - Princip chemiluminiscenční imunoanalýzy.....	52
Obrázek 17 - Rozdíl v distribuci počátečních hodnot AMH v séru a v plazmě ve vzorcích žen a mužů.....	54
Obrázek 18 - Rozdíl v distribuci počátečních hodnot AMH v séru a v plazmě.....	55
Obrázek 19 - Stabilita AMH během rozmrazování a zmrazování ve vzorcích séra a plazmy.....	57
Obrázek 20 - Stabilita AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 4 °C.....	59
Obrázek 21 - Stabilita AMH ve vzorcích séra a plazmy skladovaných při 22 °C.....	61
Obrázek 22 - Stabilita AMH měřená ve vzorcích séra a plazmy skladovaných po dobu 30 dnů při -20 °C.....	63
Obrázek 23 - Stabilita tPSA, fPSA a [-2]proPSA ve vzorcích séra během rozmrazování a zmrazování.....	71

Obrázek 24 - Stabilita tPSA, fPSA a [-2]proPSA ve vzorcích séra během skladování při 4 °C.....	74
Obrázek 25 - Stabilita tPSA, fPSA a [-2]proPSA ve vzorcích séra během skladování při 22 °C.....	75
Obrázek 26 - Stabilita poměru fPSA/tPSA a PHI ve vzorcích séra během rozmrazování a zmrazování.....	83
Obrázek 27 - Stabilita poměru fPSA/tPSA a PHI ve vzorcích séra během skladování při 4 °C.....	84
Obrázek 28 - Stabilita poměru fPSA/tPSA a PHI ve vzorcích séra během skladování při 22 °C.....	85

## 8 Seznam příloh

### Příloha I

**VRZÁKOVÁ, Radana**, Václav ŠIMÁNEK, Ondřej TOPOLČAN, Vladimír VURM, David SLOUKA et al. (2023). *The Stability of the Anti-Müllerian Hormone in Serum and Plasma Samples under Various Preanalytical Conditions*. *Diagnostics*. Online. 21.4., vol. 13, no. 8, s. 1501. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081501>. [IF 2023: 3,6]

### Příloha II

ŠIMÁNEK, Václav, **Radana VRZÁKOVÁ**, Roman VITÁK, Michal JIRÁSKO, Tomáš FÜRST et al. (2024). *Preanalytical stability of molecular forms of prostate-specific antigen in serum samples (PSA, free PSA, [-2]proPSA) and their impact on fPSA/tPSA ratio and PHI*. *The Prostate*. Online. 14.2., e24681. ISSN: 1097-0045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pros.24681>. [IF 2023: 2,8]

### Příloha III

BABUSKA, Vaclav, Phanindra Babu KASI, Petra CHOCHOLATA, Lucie WIESNEROVA, Jana DVORAKOVA, **Radana VRZAKOVA** et al. (2022). *Nanomaterials in Bone Regeneration*. *Applied Sciences*. Online. 5.7., vol. 12, no. 13, s. 6793. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app12136793>. [IF 2023: 2,7]

## Příloha I

**VRZÁKOVÁ, Radana**, Václav ŠIMÁNEK, Ondřej TOPOLČAN, Vladimír VURM, David SLOUKA et al. (2023). *The Stability of the Anti-Müllerian Hormone in Serum and Plasma Samples under Various Preanalytical Conditions*. *Diagnostics*. Online. 21.4., vol. 13, no. 8, s. 1501. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081501>.  
[IF 2023: 3,6]

## Příloha II

ŠIMÁNEK, Václav, **Radana VRZÁKOVÁ**, Roman VITÁK, Michal JIRÁSKO, Tomáš FÜRST et al. (2024). *Preanalytical stability of molecular forms of prostate-specific antigen in serum samples (PSA, free PSA, [-2]proPSA) and their impact on fPSA/tPSA ratio and PHI*. The Prostate. Online. 14.2., e24681. ISSN: 1097-0045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pros.24681>.

[IF 2023: 2,8]

## Příloha III

BABUSKA, Vaclav, Phanindra Babu KASI, Petra CHOCHOLATA, Lucie WIESNEROVA, Jana DVORAKOVA, **Radana VRZAKOVA** et al. (2022). *Nanomaterials in Bone Regeneration*. Applied Sciences. Online. 5.7., vol. 12, no. 13, s. 6793. ISSN 2076-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/app12136793>.  
[IF 2023: 2,7]