

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

---



VYUŽITÍ MODERNÍCH BIOTECHNOLOGICKÝCH POSTUPŮ PŘI  
VÝVOJI STANOVENÍ NOVÝCH MOLEKUL S OVĚŘENÍM  
V KLINICKÉ PRAXI  
(možnosti jejich stanovení, ověření vybraných hypotéz, klinické aplikace)

DISERTAČNÍ PRÁCE

OLOMOUC 2014

Marek Švesták



VYUŽITÍ MODERNÍCH BIOTECHNOLOGICKÝCH POSTUPŮ PŘI  
VÝVOJI STANOVENÍ NOVÝCH MOLEKUL S OVĚŘENÍM  
V KLINICKÉ PRAXI  
(možnosti jejich stanovení, ověření vybraných hypotéz, klinické aplikace)

DISERTAČNÍ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Marek Švesták  
ŠKOLITEL: prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D. MBA EurChem  
OBOR: Lékařská chemie a klinická biochemie

*Disertační práce byla vypracována na Oddělení laboratorní medicíny Středomoravské nemocniční a.s. a ve výzkumných laboratořích firmy Biovondor laboratorní medicína a.s. v období let 2008 – 2013.*

Prohlašuji, že jsem se podílel na přípravě rekombinantních proteinů a protilátek použitých v ELISA testech, včetně optimalizace jejich podmínek, samostatně provedl ověření analytických charakteristik ELISA souprav, ověřil jejich efektivitu při stanovení vybraných molekul v rámci klinických studií a použil pouze pramenů, které cituji v seznamu použité literatury.

V Olomouci, 14. 4. 2014

-----  
Mgr. Marek Švesták

## **Poděkování**

Děkuji zejména svému školiteli prof. MUDr. Davidu Stejskalovi, Ph.D. MBA EurChem, za pomoc při koncipování disertační práce a za rady i připomínky k mojí práci.

Také děkuji pracovníkům firmy Biovendor laboratorní medicína a.s., zejména Ing. Michalu Karpíškovi za praktické rady a pomoc při návrhu, vývoji a testování ELISA souprav.

Dále děkuji prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., za projevenou velkou trpělivost v průběhu mého doktorského studia.

## **SOUHRN**

### **Úvod:**

Diagnostika onemocnění hromadného výskytu (cluster chorob sdružujících se do tzv. metabolického syndromu, choroby skeletu, vybraná maligní onemocnění, atp.) je založena často na nepřímých a méně specifických vyšetřovacích postupech. V poslední době se do popředí dostává diagnostika těchto chorob pomocí laboratorních metod, které jsou charakteristické vysokou diagnostickou efektivitou stanovení.

Do clusteru chorob, které jsou propojeny s metabolickým syndromem patří i vybraná onemocnění mozku. Diagnostika chorob centrální nervové soustavy (CNS) je často obtížná (především pro lékaře první linie - mozkové příhody, Alzheimerova nemoc, traumata centrální nervové soustavy, atp.). Jde přitom o závažný zdravotně sociální problém. Např. mozkové příhody jsou třetí nejčastější příčinou smrti po chorobách kardiovaskulárního systému a nádorových onemocněních. Ideální biomarker poškození centrální nervové soustavy, který by bylo možno vyšetřit v periferní krvi, a splňoval by podobné nároky jako např. srdeční troponiny nebo natriuretické peptidy při postižení myokardu, nemáme zatím k dispozici, nicméně probíhá intenzivní snaha o jeho hledání.

Podobně jako u onemocnění uvedených výše jsou i choroby skeletu obtížně diagnostikovatelné, a to především v jejich časných fázích. Tato latence může být z hlediska další prognózy choroby nebezpečná pro svou ireversibilitu.

Také v rámci onkologické diagnostiky jsou díky moderní a sofistikované terapii hledány ukazatele, které jsou vysoce specifické a dostatečně senzitivní pro záchyt časných fází maligního onemocnění.

### **Cíle disertační práce:**

Hlavním cílem mé disertační práce byla spolupráce na vývoji ELISA souprav pro specifická stanovení koncentrací vybraných molekul, ověření jejich analytických charakteristik provedením základní laboratorní validace a současně provedení klinického testování efektivity stanovení vybraných molekul.

1. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro stanovení koncentrace osteokrinu a ověření efektivity tohoto testu u pacientů s osteoporózou.
2. Ověření dříve publikovaného předpokladu na jiném typu populace (japonská) o eventuální souvislosti mezi koncentrací PEDF v séru a rizikem rozvoje metabolického syndromu u kavkazské populace.
3. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského VILIP-1. Hledání souvislostí mezi koncentrací VILIP-1 v séru a ostatními ukazateli poškození mozkových buněk u pacientů s mozkovou mrtvicí.

4. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského sekretagoginu. Hledání souvislosti mezi koncentrací sekretagoginu v séru a ostatními ukazateli poškození mozkových buněk u pacientů s mozkovou mrtvicí. Stanovení referenčních hodnot pro sekretagogin u zdravých fyziologických novorozenců.
5. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro rychlé stanovení Dkk-1 a ověření efektivity tohoto testu u pacientů s osteoporózou.
6. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro stanovení koncentrace chemerinu a ověření efektivity tohoto testu u pacientů s metabolickým syndromem.
7. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro stanovení PSP-94 a ověření diagnostické efektivity stanovení PSP-94 u pacientů s karcinomem prostaty.
8. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro stanovení TFF a ověření diagnostické efektivity stanovení TFF v různých situacích.
9. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro stanovení S100A a ověření diagnostické efektivity stanovení S100A u žen s karcinomem endometria.

### **Experimentální část:**

V rámci spolupráce na vývoji ELISA souprav pro specifická stanovení koncentrací vybraných molekul byly vyvinuty a validovány soupravy pro stanovení VILIP-1, Dkk-1, osteokrinu, sekretagoginu, chemerinu, PEDF, PSP-94, TFF a S100-A11.

Pro ověření funkčnosti těchto souprav a jejich využití v klinické praxi bylo provedeno celkem 9 klinických studií, které se zabývaly stanovením koncentrace VILIP-1 u osob s mozkovou příhodou (2 studie, 10+33 probandů), Dkk-1 u osob s osteoporózou (34 probandů), osteokrinu u osob s osteoporózou (118 probandů), chemerinu a PEDF u osob s metabolickým syndromem (231 probandů a 112 probandů), sekretagoginu u osob s kraniotraumatem (139 probandů), fyziologických novorozenců (686 probandů) a kontrolní skupinou zdravých dárců (41 probandů), PSP-94 u osob s podezřením na karcinom prostaty (121 probandů), TFF a S100A-11 u žen s podezřením na karcinom endometria (44 probandů).

V rámci klinických studií byly vyšetřeny v různém zastoupení a frekvenci i další laboratorní ukazatele; byly stanoveny sérové koncentrace TAG, LDL, HDL i celkového cholesterolu, ApoA-I, ApoB, albuminu, CRP, cystatinu C, fibrinogenu, IgG, IgA, IgM, haptoglobinu, PSA, volného PSA, prealbuminu, AIF-I, Ca-125, S100A-11, glukózy, kyseliny močové, inzulinu. Současně byly u vybraných osob

změřeny v séru aktivity ALT, AST, CK. U vybraných pacientů byly stanoveny i podobné parametry v likvoru; navíc v něm byly ještě měřeny koncentrace  $\tau$ -proteinu a  $\beta$ -amyloidu.

V rámci některých studií byl vypočten index tělesné hmotnosti BMI ( $\text{kg m}^{-2}$ ) a změřena kostní densita (DEXa, přístroj Hologic 4500).

### **Výsledky:**

1. Byla vyvinuta ELISA souprava pro stanovení osteokrinu v séru. Mez detekce činila  $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ , opakovatelnost (CV)  $<10 \%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $\leq 10 \%$ , výtěžnost  $94 \%$ , linearita  $120 \%$ .

V rámci pilotní klinické byla vyšetřena skupina 98 jedinců léčených pro metabolický syndrom a skupina zdravých osob (20 osob, neléčených ani nesledovaných pro žádné onemocnění). Nebyly zjištěny žádné souvislosti mezi hodnotami osteokrinu a ostatními měřenými ukazateli. Koncentrace osteokrinu v séru se nelišily ani podle pohlaví, podle výskytu rezistence k inzulinu ani výskytu dyslipidemie.

2. Byla vyvinuta, optimalizována a validována ELISA souprava pro stanovení PEDF v séru. Mez detekce činila  $0,045 \mu\text{g l}^{-1}$ , mez stanovitelnosti  $0,36 \text{ mg l}^{-1}$ , opakovatelnost (CV)  $<10 \%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $<10 \%$ , výtěžnost  $101 \%$ , linearita  $97 \%$ ; při testování křížové reaktivity použitých protilátek se souborem sér jiných živočišných druhů byla zjištěna křížová reaktivita pouze u kočičího a opičího séra - protilátky použité v ELISA jsou specifické pro lidský PEDF; nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmrážení ( $5\times$ ) vzorků ani skladování vzorků při  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 7 dnů na koncentraci PEDF ve vzorcích.

V rámci klinické studie bylo zjištěno, že koncentrace PEDF v séru se nelišila mezi muži a ženami (průměr  $15,9$  vs.  $16,7 \text{ mg l}^{-1}$ ) a korelovala s BMI ( $r = 0,32$ ,  $p < 0,01$ ), CRP ( $r = 0,33$ ,  $p < 0,01$ ) a inzulinem ( $r = 0,082$ ,  $p < 0,05$ ). Jedinci s MetSy (kritéria NCEP ATPIII,  $n=72$ ) měli signifikantně zvýšenou koncentraci PEDF v séru oproti zdravým jedincům bez MetSy (bez přítomnosti složek metabolického syndromu,  $n=40$ , medián  $15,6 \text{ mg l}^{-1}$  vs.  $11,2 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $p < 0,01$ ). Senzitivita a specifická stanovení koncentrace PEDF v séru pro diagnostiku přítomnosti MetSy byla  $57,9 \%$ , respektive  $86,7 \%$  při zvolené hodnotě *cut-off*  $14,9 \text{ mg l}^{-1}$  (plocha pod operační křivkou ROC  $0,75$ ;  $95 \%$  interval spolehlivosti  $0,55-0,87$ ).

3. Byla vyvinuta, optimalizována a validována ELISA souprava pro stanovení VILIP-1 v séru i likvoru. Mez detekce činila  $0,027 \mu\text{g l}^{-1}$ , mez

stanovitelnosti  $0,081 \mu\text{g l}^{-1}$ , opakovatelnost (CV)  $<10 \%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $<10 \%$ , výtěžnost  $105 \%$ , linearita  $88,9 \%$ ; při testování křížové reaktivity použitých protilátek se souborem sér jiných živočišných druhů byla zjištěna křížová reaktivita pouze u kozího séra - protilátky použité v ELISA testu jsou specifické pro lidský VILIP-1; nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5\times$ ) vzorků ani skladování vzorků při  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 7 dnů na koncentraci VILIP-1 ve vzorcích.

V rámci 2 klinických studií bylo zjištěno, že osoby s mozkovou příhodou ( $n=10$ ) měly vyšší hodnoty VILIP-1 v séru než osoby bez neurologického postižení CNS ( $n=10$ ); všichni jedinci s CMP měli hodnoty VILIP-1  $>0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ); jedinci bez postižení CNS měli hodnoty  $<0,05 \mu\text{g l}^{-1}$  (senzitivita  $85,7 \%$ , specifičnost  $100 \%$ ).

Byly nalezeny signifikantní rozdíly v koncentraci VILIP-1 v séru i likvoru mezi skupinou zdravých ( $n=17$ ) a s mozkovou mrtvicí ( $n=16$ ): v séru  $0,03/1,78 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p < 0,01$  a v likvoru  $0,07/0,16 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p < 0,01$ ; senzitivita i specifičnost stanovení koncentrace VILIP-1 v séru pro klinickou diagnostiku mozkové mrtvice činila v rámci těchto studií  $100 \%$ .

Sérové hladiny VILIP-1 korelovaly s koncentrací ApoA-I ( $r=-0,23$ ,  $p=0,02$ ), s indexem ApoA-I likvor/sérum ( $r=-0,23$ ,  $p=0,04$ ) a koncentrací VILIP-1 v likvoru ( $r=0,4$ ,  $p < 0,01$ ).

4. Byla vyvinuta, optimalizována a validována ELISA souprava pro stanovení sekretagoginu v séru. Mez detekce byla  $11 \text{ ng l}^{-1}$ , mez stanovitelnosti  $33 \text{ ng l}^{-1}$ , opakovatelnost (CV)  $<10 \%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $<10 \%$ , výtěžnost  $92 \%$ , linearita  $107 \%$ ; nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5\times$ ) vzorků ani skladování vzorků při  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 7 dnů na koncentraci sekretagoginu ve vzorcích.

Při klinickém ověření diagnostické efektivity za pomoci ROC analýzy pro stanovení SCGN v séru u pacientů s kraniotraumatem ( $n=98$ ) byla určena při cut-off hodnotě  $96 \text{ ng l}^{-1}$  senzitivita  $85 \%$  a specifičnost  $89 \%$ ; plocha pod operační křivkou ROC byla  $0,87$  ( $p < 0,01$ ) (mediány  $25$  vs.  $194 \text{ ng l}^{-1}$ ). Diagnostická efektivita se nelišila mezi stanovením S100 a SCGN, byla však významně vyšší než u pNF-H, GFAP i Hsp70 ( $p < 0,05$ ).

V rámci druhé části pilotní studie byly stanoveny referenční hodnoty u fyziologických zdravých novorozenců ( $n=686$ ,  $99 \%$  CI  $5-64 \text{ ng l}^{-1}$ , průměr  $29,5 \text{ ng l}^{-1}$ , normální rozložení dat). Nebyla nalezena souvislost mezi Apgar-skore ani pH krve.



5. Byla vyvinuta, optimalizována a validována ELISA souprava pro stanovení Dkk-1v séru. Mez detekce činila  $0,01 \mu\text{g l}^{-1}$ , mez stanovitelnosti  $0,03 \mu\text{g l}^{-1}$ , opakovatelnost (CV)  $<10\%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $<10\%$ , výtěžnost  $95\%$ , linearita  $93\%$ ; nebyla zjištěna křížová reaktivita použitých protilátek se séry jiných živočišných druhů; nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5\times$ ) vzorků ani skladování vzorků při  $2-8^\circ\text{C}$  po dobu 7 dnů na koncentraci Dkk-1 ve vzorcích.

V rámci klinické studie ( $n=34$ ) byly nalezeny významné rozdíly mezi hodnotami Dkk-1 podle přítomnosti osteoporózy. Významnost rozdílů přetrvávala i po adjustaci na pohlaví, věk a další sledované parametry. Efektivita testu pro klinické účely byla uspokojivá (plocha pod operační křivkou ROC  $0,92$ ;  $95\%$  interval spolehlivosti  $0,78-0,99$ ; senzitivita  $78\%$ , specifická  $100\%$ , pozitivní prediktivní hodnota  $100\%$  při hodnotě Dkk-1  $>3,86 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

6. Byla vyvinuta, optimalizována a validována ELISA souprava pro stanovení chemerinu v séru. Mez detekce činila  $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ , mez stanovitelnosti  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ , opakovatelnost (CV)  $<10\%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $<10\%$ , výtěžnost  $96\%$ , linearita  $103\%$ ; nebyla zjištěna křížová reaktivita použitých protilátek se séry jiných živočišných druhů, nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5\times$ ) vzorků ani skladování vzorků při  $2-8^\circ\text{C}$  po dobu 7 dnů na koncentraci chemerinu ve vzorcích.

V rámci klinické studie ve skupině zdravých jedinců ( $n=50$ ) nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentraci chemerinu mezi muži a ženami (průměrné hodnoty u žen  $196,7 \mu\text{g l}^{-1}$ ; u mužů  $171,2 \mu\text{g l}^{-1}$ ). Ve skupině jedinců ( $n=59$ ) s vysokým rizikem metabolického syndromu (MetSy) byla zjištěna významně zvýšená koncentrace chemerinu v séru v porovnání s jedinci ( $n=122$ ) bez přítomnosti MetSy nebo zdravými jedinci (nenormální rozložení dat, medián  $266, 230, 192,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ;  $p<0,01$ ). Byly nalezeny významné pozitivní korelace mezi koncentrací chemerinu v séru a věkem probandů ( $r=0,23$ ;  $p<0,01$ ), chemerinem a glukózou ( $r=0,23$ ;  $p<0,01$ ), chemerinem a HDL cholesterolem ( $r=-0,19$ ;  $p<0,01$ ), chemerinem a TAG ( $r=0,22$ ;  $p<0,01$ ), chemerinem a systolickým/diastolickým krevním tlakem ( $r=0,40, p<0,01$ ;  $r=0,24, p<0,01$ ).

ROC analýzou byla stanovena diagnostická efektivita stanovení sérového chemerinu pro diagnostiku přítomnosti MetSy. Bylo zjištěno, že stanovení má senzitivitu  $75\%$  a specifická  $67\%$  (plocha pod operační křivkou ROC  $0,75$ ;  $95\%$  interval spolehlivosti  $0,68-0,81$ ) při sérové hodnotě (cut-off) chemerinu  $240 \mu\text{g l}^{-1}$ . Byla nalezena významná pozitivní souvislost mezi koncentrací chemerinu v séru a počtem kritérií pro diagnostiku MetSy a tato shoda byla potvrzena provedením chí kvadrát testu ( $\chi^2=66,5$ ;  $p<0,01$ ).

7. Byla vyvinuta, optimalizována a validována ELISA souprava pro stanovení PSP-94 v séru. Mez detekce činila  $0,12 \mu\text{g l}^{-1}$ , mez stanovitelnosti  $0,6 \mu\text{g l}^{-1}$ , opakovatelnost (CV)  $<10 \%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $<10 \%$ , výtěžnost  $94,4 \%$ , linearita  $104,2 \%$ ; nebyla zjištěna křížová reaktivita použitých protilátek se séry jiných živočišných druhů; nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5\times$ ) vzorků ani skladování vzorků při  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 7 dnů na koncentraci PSP-94 ve vzorcích.

V rámci klinické studie bylo zjištěno, že 49 osob nemělo žádné onemocnění, 27 mělo chronický zánět prostaty a 45 bylo po radikální prostatektomii (RAPPE). Hodnoty PSP-94 souvisely s koncentrací PSA a volným PSA ( $r=0,41$ ,  $p<0,01$ ). Osoby po RAPPE měly nejnižší hodnoty PSA, nicméně v hodnotách PSP-94 se testovaní pacienti významně nelišili (16 vs. 20 vs.  $11,8 \mu\text{g l}^{-1}$ ; zdraví vs. prostatitis vs. RAPPE), i když jedinci po RAPPE měli hodnoty nejnižší. Souvislost mezi Gleasonským skóre a PSP-94 se nepodařilo prokázat.

8. Byla vyvinuta, optimalizována a validována ELISA souprava pro stanovení TFF-1, TFF-2 a TFF-3 v séru. Mez detekce pro TFF-1 byla  $0,019 \mu\text{g l}^{-1}$ , pro TFF-2  $0,044 \mu\text{g l}^{-1}$  a pro TFF-3  $0,007 \mu\text{g l}^{-1}$ , mez stanovitelnosti  $0,095/0,22/0,035 \mu\text{g l}^{-1}$  (TFF-1/TFF-2/TFF-3), opakovatelnost (CV)  $<10\%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $<10\%$ , výtěžnost  $106,3/98,9/102,7 \%$ , linearita  $102,6/97,4/95,0 \%$  (TFF-1/TFF-2/TFF-3); nebyla zjištěna křížová reaktivita použitých protilátek se séry jiných živočišných druhů; nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5\times$ ) vzorků ani skladování vzorků při  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 7 dnů na koncentraci TFF ve vzorcích.

V rámci klinické studie ( $n=44$ ) bylo zjištěno, že ženy s karcinomem měly významně zvýšené sérové hodnoty TFF-3 (TFF-3  $2,7$  vs.  $1,0 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p<0,05$ ). Ve skupině žen s karcinomem endometria nebyl zjištěn významný rozdíl v koncentracích Ca-125, TFF-1, TFF-2 a AIF-1.

9. Byla vyvinuta, optimalizována a validována ELISA souprava pro stanovení S100A-11 v séru. Mez detekce činila  $0,007 \mu\text{g l}^{-1}$ , mez stanovitelnosti  $0,021 \mu\text{g l}^{-1}$ , opakovatelnost (CV)  $<12 \%$ , mezilehlá preciznost (CV)  $<12 \%$ , výtěžnost  $99 \%$ , linearita  $94 \%$ ; při testování křížové reaktivity použitých protilátek se souborem sér jiných živočišných druhů byla zjištěna křížová reaktivita se séry těchto druhů: opice, křeček, prase, králík a krysa; nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5\times$ ) vzorků ani skladování vzorků při  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 7 dnů na koncentraci S100A-11 ve vzorcích.

V rámci klinické studie ( $n=44$ ) bylo zjištěno, že ženy s karcinomem měly významně zvýšené sérové hodnoty S100A-11 (S100A-11 7,2 vs. 4,2  $\mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p < 0,01$ ). Ve skupině žen s karcinomem endometria nebyl zjištěn významný rozdíl v koncentracích Ca-125, TFF-1, TFF-2 a AIF-1. Na základě výsledků regresní analýzy (data nejsou uvedena) bylo, jako ukazatel první volby při diagnostice karcinomu endometria, doporučeno využít ze všech parametrů pouze stanovení sérové koncentrace S100A-11.

### **Závěry:**

Byla navržena, optimalizována a validována diagnostická souprava pro stanovení osteokrinu, PEDF, VILIP-1, sekretagoginu, chemerinu, PSP-94, TFF-1/2/3 v séru i plazmě. Dkk-1 a S100A-11 bylo doporučeno stanovovat pouze v séru. VILIP-1 lze stanovit v séru i v likvoru. Všechny ELISA soupravy vykazovaly uspokojivé analytické charakteristiky a potencionální klinická diagnostická využitelnost byla ověřena v devíti klinických studiích.

Na základě poznatků, vyplývajících z provedených klinických studií a z toho, že většina z nově vyvinutých ELISA souprav našla uplatnění na řadě pracovišť, se lze domnívat, že by mohlo jít o nezávislé a potenciální ukazatele využitelné nejen ve vědeckých studiích, ale pravděpodobně i při diagnostice vybraných onemocnění hromadného výskytu.

Při interpretaci závěrů je třeba zdůraznit fakt, že exprese genů se často liší od koncentrace jejich produktů v séru, a že řada hypotéz o možném praktickém využití znalosti koncentrace nových molekul na základě znalosti jejich exprese v klinické praxi může selhávat. Je tedy nezbytné odlišit mezi expresí genu (mRNA) a koncentrací jeho produktu v cirkulaci.

### **Klíčová slova:**

VILIP-1, Dkk-1, osteokrin, sekretagogin, chemerin, PEDF, PSP-94, TFF, ELISA, metabolický syndrom, osteoporóza, karcinom endometria, karcinom prostaty.

## **SUMMARY**

### **Introduction:**

The diagnosis of diseases of mass occurrence including a cluster of diseases associated with the so-called metabolic syndrome, bone disease and selected malignant disease, is based on circumstantial and less often specific investigative procedures. Recently, to the forefront in the diagnosis of these diseases have come laboratory methods characterized by high specificity of determination.

First, the diagnosis of diseases and conditions of the central nervous system (CNS) including stroke, Alzheimer's disease and trauma is often difficult, especially for first line physicians - etc. This is a serious health and social problem given for example that stroke is the third leading cause of death after cardiovascular disease and cancer. There is no ideal biomarker of CNS damage which could be examined in peripheral blood and which would meet similar criteria to cardiac troponins and natriuretic peptides in cardiology .

Second, like CNS conditions, bone diseases are difficult to diagnose, especially in the early phase. This delay can have serious consequences for prognosis given the irreversibility of the disease.

Third, in oncological diagnostics there are also potentially useful trefoils proteins (TFF). TFF are a family of at least three related low molecular weight peptides. If damaged mucosa is formed, there is an increase in their concentration and this contributes to mucosal healing and renewal of the epithelium. Their presence, however, is associated with various systemic inflammatory conditions and cancers.

### **The aim of this dissertation thesis:**

1. The development, validation and verification of ELISA test for determining the concentration of osteocrin in serum and confirming the validity of this test in patients with osteoporosis.
2. Verification whether PEDF serum levels are related to the risk of developing the metabolic syndrome in Caucasians.
3. The development, validation and clinical testing of specific ELISA kits for determining VILIP-1 in human serum and search for correlations between concentration of VILIP-1 levels and other indicators of brain cell damage in patients with stroke.
4. The development, validation and clinical testing of specific ELISA kits for determining secretagogin in human serum; relationships between the concentration and other indicators of cell damage in patients with stroke. Determination of reference values for secretagogin in healthy physiological infants.

5. The development, validation and verification of ELISA assay for determining Dkk-1 and testing the validity of this test in patients with osteoporosis.
6. Verification of determination of chemerin concentration and its clinical efficacy in the diagnostics of the metabolic syndrome.
7. The development, validation and clinical testing of specific ELISA kits for determining PSP-94; verification of the effectiveness of the diagnostic determination of PSP-94 in patients with prostate cancer.
8. Verification of the diagnostic efficiency of TFF determination in different situations.
9. The development, validation and clinical testing of specific ELISA kits for determining S100A; verification of the effectiveness of the diagnostic determination of PSP-94 in women with endometrial carcinomas.

### **Experimental part:**

Cooperation in the development of ELISA kits specific for the determination of concentrations of selected molecules were developed and validated kits for VILIP-1, Dkk-1, osteocrin, secretagogin, chemerin, PEDF, PSP-94 and TFF. To verify the functionality of these kits and their use in clinical practice, a total of 9 clinical studies that address the determination of the concentration of VILIP-1 in patients with stroke (2 studies, 10 + 33 probands), Dkk-1 in patients with osteoporosis (34 probands), osteocrin in patients with osteoporosis (118 probands), chemerin and PEDF in subjects with metabolic syndrome (231 probands and 112 probands), secretagogin in patients with cranial trauma, infants (686 probands) and a control group of healthy donors (41 probands), PSP-94 in patients with suspected prostate cancer (121 probands) and TFF in women with suspected endometrial carcinoma (44 probands).

In clinical studies were investigated other laboratory markers with different frequency, TAG, LDL, HDL, cholesterol, ApoA, ApoB, albumin, TAU protein, amyloid-beta, clusterin, CRP, cystatin-C, fibrinogen, haptoglobin, IgA, IgG, IgM, prealbumin, PSA, free PSA, AIF-1, Ca-125, S100-11, glucose, uric acid, CK, insulin, ALT, AST, body mass index (BMI, kg/m<sup>2</sup>) and measured bone density (DEXa, Hologic 4500 device).

### **Results:**

1. The kit for determination of osteocrin has been developed, optimized and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection 0.5 µg l<sup>-1</sup>, intra-assay reproducibility (CV) <10%, inter-assay reproducibility (CV) <10%, %, spiking recovery > 94 %, linearity > 120%; no cross-reactivity was found

with sera from other animal species, no effect of sample freezing/thawing (5×) or concentration of osteocrin in the samples stored at 2-8 °C for 7 days.

In clinical studies, there was no relation between the values of osteocrin and other measured parameters; concentration of osteocrin did not differ by gender, according to resistance to insulin, or dyslipidemia.

2. The kit for determination of PEDF was developed, optimised and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection  $0.045 \mu\text{g l}^{-1}$ , intra-assay reproducibility (CV) < 10%, inter-assay reproducibility (CV) < 10%, spiking recovery 101 %, linearity 97 %; no cross-reactivity was found with sera from other animal species; no effect of sample freezing/thawing (5×) or concentration of PEDF in samples stored at 2-8 °C for 7 days.

In the clinical study, there was no significant difference in the concentration of PEDF for males and females (mean  $15.9$  vs.  $16.7 \text{ mg l}^{-1}$ ) but there was a correlation with BMI ( $r = 0.32$ ,  $P < 0.01$ ) CRP ( $r = 0.33$ ,  $P < 0.01$ ) and insulin ( $r = 0.082$ ,  $P < 0.05$ ). Individuals with metabolic syndrome (NCEP ATP III criteria,  $n = 72$ ) had significantly higher concentrations of PEDF compared to healthy subjects without metabolic syndrome (without the presence of components of metabolic syndrome,  $n = 40$ ), (median  $15.6 \text{ mg l}^{-1}$  and  $11.2 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ).

Sensitivity and specificity of the concentration of PEDF for diagnosing the metabolic syndrome was 57.9 % respectively 86.7 % at the chosen cut-off value of  $14.9 \text{ mg l}^{-1}$  (AUC 0.75; 95% CI 0.55 to 0.87).

3. The kit for determination of VILIP was developed, optimized and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection  $0.027 \mu\text{g l}^{-1}$ , intra-assay reproducibility (CV) < 10%, inter-assay reproducibility (CV) < 10%, spiking recovery 105 %, linearity 88,9 %; no cross-reactivity was found with sera from other animal species, no effect of sample freezing / thawing (5×) or concentration of VILIP-1 in the samples stored at 2-8 °C for 7 days.

During the 2 clinical studies we found that people with stroke ( $n = 10$ ) had higher values of VILIP-1 than those without CNS impairment (all individuals with CMP had values  $\text{VILIP-1} > 0.05 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ), individuals without CNS involvement had values  $\text{VILIP-1} < 0.05 \text{ mg l}^{-1}$  (sensitivity 85.7 %, specificity 100 %) and there was no significant difference in the concentration of VILIP-1 in serum and cerebrospinal fluid of healthy persons or persons with stroke.

Significant differences were found in the concentration of VILIP-1 in serum and cerebrospinal fluid of healthy people and patients with stroke: 0.03 /

1.78 mg l<sup>-1</sup>, P < 0.01, and CSF 0.07/0.16 mg l<sup>-1</sup>, P < 0.01; sensitivity and specificity for the serum concentration of VILIP-1 for clinical diagnosis of stroke was 100 %.

Serum concentration of VILIP-1 correlated with the concentration of ApoA-I (r = -0.23, P = 0.02), with an index of ApoA-I, CSF / serum (r = -0.23, P = 0.04) and concentration VILIP-1 in CSF (r = 0.4, P < 0.01).

4. The kit for determination of secretagoin was developed, optimized and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection 11 ng l<sup>-1</sup>, intra-assay reproducibility (CV) < 10 %, inter-assay reproducibility (CV) < 10 %, spiking recovery 92 %, linearity 107 %; no cross-reactivity was found with sera from other animal species; no effect of sample freezing/thawing (5×) or concentration of secretagoin in samples stored at 2-8 °C for 7 days.

Sensitivity and specificity of the concentration of SCGN for patients with cranial trauma (n=98) was 85 % and specificity 89 %, AUC 0.87 (P<0.01). Diagnostic efficiency did not differ between the determination of S100 and SCGN, but was significantly higher than pNF-H, GFAP and Hsp70 (P < 0.05). In the second study reference values for healthy infants were determined (n=686, 99 % CI 5-64 ng l<sup>-1</sup>, mean 29,5 ng l<sup>-1</sup>). No relationship between Apgar-score and blood pH was found.

5. The kit for determination of Dkk-1 was developed, optimized and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection 0.01 µg l<sup>-1</sup>, intra-assay reproducibility (CV) < 10 %, inter-assay reproducibility (CV) < 10 %, spiking recovery 95 %, linearity 93 %; was found no cross-reactivity with sera from other animal species, no influence for samples freezing/thawing (5×) or concentration of Dkk-1 in the samples stored at 2-8 °C for 7 days.

In clinical studies (n=34) have found significant differences between the values of Dkk-1 by the presence of osteoporosis. The significance of differences persisted even after adjusting for gender, age and other monitored parameters. Efficiency for clinical purposes was excellent (AUC 0.92; 95 % CI 0.78-0.99; sensitivity 78 %, specificity 100 %, 100 % positive predictive value at a value of Dkk-1 > 3.86 µg l<sup>-1</sup>).

6. The kit for determination of chemerin was developed, optimized and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection 0.1 µg l<sup>-1</sup>, intra-assay reproducibility (CV) < 10 %, inter-assay reproducibility (CV) < 10 %, spiking recovery 96 %, linearity 103 %; no cross-reactivity was found with sera from other animal species; no effect of sample freezing/thawing (5×) or concentration of chemerin in samples stored at 2-8 °C for 7 days.

In a clinical study in healthy subjects ( $n=50$ ), there was no significant difference in concentration of chemerin between men and women (women  $196.7 \mu\text{g l}^{-1}$ , males  $171.2 \mu\text{g l}^{-1}$ ). In subjects with a high risk of MetSy ( $n=59$ ) significantly elevated concentration of chemerin levels were found compared to individuals without the presence of MetSy ( $n=122$ ) and healthy individuals (non-normal distribution of the data, median 266, 230,  $192.5 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ). We found a significant positive correlation between chemerin and age ( $r = 0.23$ ,  $P < 0.01$ ), chemerin and glucose ( $r = 0.23$ ,  $P < 0.01$ ), and HDL cholesterol and chemerin ( $r = -0.19$ ,  $P < 0.01$ ); chemerin and TAG synthesis ( $r = 0.22$ ,  $P < 0.01$ ); chemerin and systolic/diastolic blood pressure ( $r = 0.40$ ,  $P < 0.01$ ,  $r = 0.24$ ,  $P < 0.01$ ). The efficiency for diagnosing the presence of the metabolic syndrome was excellent: sensitivity 75 %, specificity 67 % (AUC 0.75; 95 % CI 0.68-0.81; LR + 2.22) when the cut-off of chemerin was set to  $240.0 \mu\text{g l}^{-1}$ . A significant agreement between chemerin concentrations in serum and number of criteria for the diagnosis of metabolic syndrome was found and confirmed by a highly significant the chi-squared test ( $\chi^2 = 66.5$ ,  $P < 0.01$ ).

7. The kit for determination of PSP-94 was developed, optimized and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection  $0.12 \mu\text{g l}^{-1}$ , intra-assay reproducibility (CV)  $< 10 \%$ , inter-assay reproducibility (CV)  $< 10 \%$ , spiking recovery 94.4 %, linearity 104.2 %; we found no cross-reactivity with sera from other animal species, no effect of samplefreezing/thawing ( $5\times$ ) or concentration of PSP-94 in samplesstored at  $2-8^\circ\text{C}$  for 7 days.

In the clinical study, there were 49 individuals with no disease, 27 had chronic prostatitis and 45 were after RAPPE. PSP-94 values were related to the concentrations of PSA and free PSA ( $r \geq 0.41$ ,  $P < 0.01$ ). Persons after RAPPE had the lowest values of PSA, but the values of patients tested for PSP-94 did not differ significantly (16 vs 20 vs  $11.8 \mu\text{g l}^{-1}$ ; health, with prostatitis, stp RAPPE), although individuals after RAPPE had the lowest value of PSP-94. No relationship between Gleason's score and PSP-94 was confirmed.

8. The kit for determination of TFF-1, TFF-2 and TFF-3 was developed, optimized and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection  $0.019 / 0.044 / 0.007 \mu\text{g l}^{-1}$  (TFF-1 / TFF-2 / TFF-3), intra-assay reproducibility (CV)  $< 10 \%$ , inter-assay reproducibility (CV)  $< 10 \%$ , spiking recovery 106.3 / 98.9 / 102.7 %, linearity 102.6 / 97.4 / 95.0 % (TFF-1 / TFF-2 / TFF-3); we found no cross-reactivity with sera from other animal species, no influence on sample freezing/thawing ( $5\times$ ) or concentration of TFF-1, TFF-2 and TFF-3 in samplesstored at  $2-8^\circ\text{C}$  for 7 days.



In the clinical study ( $n=44$ ), we found that women with cancer had significantly elevated serum concentration of TFF-3 (TFF-3 2.7 vs. 1.0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ). In women with endometrial carcinoma there was no significant difference in the concentrations of Ca-125, the TFF-1, TFF-2 and AIF-1.

9. The kit for determination of S100A-11 was developed, optimized and validated. It showed satisfactory analytical characteristics (limit of detection 0.007  $\mu\text{g l}^{-1}$ , intra-assay reproducibility (CV)  $< 12\%$ , inter-assay reproducibility (CV)  $< 12\%$ , spiking recovery 99 %, linearity 94 %; we found no cross-reactivity with sera from other animal species, no influence on sample freezing/thawing ( $5\times$ ) or concentration of S100A-11 in samples stored at 2-8  $^{\circ}\text{C}$  for 7 days.

In the clinical study ( $n=44$ ), we found that women with cancer had significantly elevated serum concentration of S100A-11 (S100A-11 7.2 vs. 4.2  $\mu\text{g l}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ). In women with endometrial carcinoma, there was no significant difference in the concentrations of Ca-125, the TFF-1, TFF-2 and AIF-1. Based on the results of the regression analysis (data not shown), as an indicator of first choice in the diagnosis of endometrial cancer, the use of determining S100A-11 concentration in serum was recommended.

### **Conclusion:**

We have designed, optimized and validated diagnostic kits for determining VILIP-1, Dkk-1, secretagogin, chemerin, PEDF, PSP-94, TFF and S100A-11 ELISA kits with satisfactory analytical characteristics. We tested them in several clinical studies.

- Patients with stroke have higher VILIP-1 than those without neurological impairment.
- VILIP-1 could be a highly effective serum biomarker for stroke.
- Dkk-1 is a promising indicator, which could be used for diagnosing osteoporosis.
- We developed a new ELISA method, used in clinical testing to determine osteocin levels.
- Determination of secretagogin in patients with cranial trauma showed a sensitivity of 85 % and specificity 89 %, diagnostic efficiency did not differ between the determination of S100 and SCGN, but was significantly higher than pNF-H and GFAP). The reference values for healthy physiological infants were 5-64  $\text{ng l}^{-1}$  (99 % CI, mean 29,5  $\text{ng l}^{-1}$ ).
- In subjects with a high risk of MetSy we found significantly elevated concentration of chemerin levels compared to individuals without MetSy and healthy individuals.
- Concentration of PEDF levels correlated with BMI. Individuals with the metabolic syndrome had a significantly increased concentration of PEDF compared to healthy subjects without metabolic syndrome (without the presence of components of the

metabolic syndrome).

- PSP-94 is, along with the determination of PSA and free PSA, a potential marker for determination of prostate cancer.
- Women with endometrial carcinoma had significantly elevated serum concentration of S100A-11 and TFF-3.

There are two caveats to bear in mind in interpreting these findings.

1. the expression of molecules are often different from their concentration in the serum. 2. Many hypotheses on the practical application of peptide measurement, are not confirmed in clinical practice.

**Key words:**

VILIP-1, Dkk-1, osteocrin, secretagogin, chemerin, PEDF, PSP-94, TFF, ELISA, metabolic syndrome, osteoporosis, endometrial carcinoma, prostate cancer.

# Obsah

<b>1. Teoretická část</b> .....	1
1.1 ÚVOD .....	1
1.1.1 Osteokrin (Ostn) .....	1
1.1.2 Pigment epithelium-derived factor (PEDF) .....	2
1.1.3 Visinin like protein-1 (VILIP-1) .....	3
1.1.4 Sekretagogin (SCGN) .....	4
1.1.5 Dickkopf-1 protein (Dkk-1) .....	4
1.1.6 Chemerin .....	6
1.1.7 Prostate secretory protein 94 (PSP-94) .....	7
1.1.8 Trefoils factors (TFF proteiny, TFF-1; TFF-2; TFF-3) .....	8
1.1.9 S100A-11 .....	9
1.1.10 Metabolický syndrom (MetSy) .....	10
1.2 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) .....	10
1.2.1 Obecný úvod .....	10
1.2.2 Základní dělení (Mančal P: 1987, Wild D et al: 2013) .....	15
1.2.3 Analytická charakteristika ELISA souprav .....	19
1.2.4 Optimalizace podmínek ELISA .....	23
1.2.4.1 Sestavení ELISA .....	23
<b>2. Cíle disertační práce</b> .....	31

<b>3. Metodika</b> .....	32
3.1 Spolupráce na vývoji ELISA souprav pro specifická stanovení koncentrací vybraných molekul.....	32
<b>3.1.1 Osteokrin</b> .....	33
<b>3.1.2 PEDF</b> .....	36
<b>3.1.3 VILIP-1</b> .....	39
<b>3.1.4 SCGN</b> .....	42
<b>3.1.5 Dkk-1</b> .....	45
<b>3.1.6 Chemerin</b> .....	48
<b>3.1.7 PSP-94</b> .....	50
<b>3.1.8 TFF</b> .....	52
<b>3.1.9 S100A-11</b> .....	59
3.2 Ověření analytických charakteristik a efektivity ELISA souprav pro stanovení vybraných molekul v pilotních klinických studiích .....	63
<b>3.2.1 Technika náběrů vzorků krve</b> .....	63
<b>3.2.2 Skupiny probandů a prováděná vyšetření</b> .....	63
<b>3.2.3 Statistické zpracování dat</b> .....	68
<b>3.2.4 Používané diagnostické soupravy</b> .....	68

4.	Výsledky .....	69
4.1	Ověření analytických charakteristik ELISA souprav pro stanovení vybraných molekul.....	69
4.1.1.	<b>Osteokrin</b> .....	69
4.1.2	<b>PEDF</b> .....	74
4.1.3	<b>VILIP-1</b> .....	79
4.1.4	<b>SCGN</b> .....	84
4.1.5	<b>Dkk-1</b> .....	88
4.1.6	<b>Chemerin</b> .....	93
4.1.7	<b>PSP-94</b> .....	99
4.1.8	<b>TFF</b> .....	104
4.1.9	<b>S100A-11</b> .....	120
4.2	Ověření hypotéz a výsledků experimentálních studií v klinických pilotních studiích .....	125
4.2.1	<b>Osteokrin</b> .....	125
4.2.2	<b>PEDF</b> .....	125
4.2.3	<b>VILIP-1</b> .....	127
4.2.4	<b>SCGN</b> .....	130
4.2.5	<b>Dkk-1</b> .....	130
4.2.6	<b>Chemerin</b> .....	131

4.2.7	PSP-94.....	135
4.2.8	TFF.....	136
4.2.9	S100A-11.....	136
5.	Diskuse.....	137
6.	Závěry.....	151
7.	Vlastní publikace vztahující se k tématu .....	153
8.	Literatura .....	157

# Seznam použitých zkratek

Zkratka	Vysvětlení
3T3-L1	buněčná linie odvozená z myších fibroblastů
Ab	protilátka
AbAg	komplex protilátka-antigen
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etylbenzthiazolin-6-sulfonát)
AD	Alzheimerova choroba
AFABP	Adipocyte fatty acid-binding protein
Ag	antigen
AGS	adrenogenitální syndrom
AIF-1	Allograft inflammatory factor-1 (cytokin exprimovaný v makrofázích)
Akt	protein kináza B
ALT	alanin-aminotransferáza
AMK	aminokyselina
ANOVA	metoda analýzy rozptylu dat
AP	alkalická fosfatáza
AST	aspartát aminotransferáza
BCA	kyselina bicinchoninová
BMI	Body Mass Index
BPH	benigní hyperplazie prostaty
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CaP	karcinom prostaty
CI	interval spolehlivosti (%)
CK	kreatin kináza
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervová soustava
CRP	C-reaktivní protein
CRISP-3	Cysteine-Rich Secretory Protein-3
CT	počítačová tomografie
CTGF	růstový faktor pro pojivovou tkáň
CTRP1	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1
CV	variační koeficient
CYP11B2	aldosteron syntáza
Db/Db	myší fenotyp bez funkčního leptinového receptoru (dlouhé formy ObRb)
DEXa	dvoufotonová kostní denzitometrie
Dkk-1	Dickkopf-1
DLB	demence způsobená Lewyho tělisky
DM2	Diabetes mellitus 2. typu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPD	deoxypyridinolin
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ES	karcinom endometria
FSH	folikuly stimulující hormon
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GIT	gastrointestinální trakt
Glu	kyselina glutamová
GLUT4	inzulinem regulovaný transportér pro glukózu
HAMA	lidské anti-myší protilátky

Zkratka	Vysvětlení
HbA1c	glykovaný hemoglobin- frakce A1c
HDL	cholesterol o vysoké hustotě (HDL cholesterol)
HEK 293	Human Embryonic Kidney Cells
His	histidin
HRP	křenuvová peroxidáza
HSP	lidský spasmolytický polypeptid
ICC	intrahepatální cholangiokarcinom
IgG	imunoglobulin G
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
IVD	značka pro diagnostika schválené pro in vitro použití
$k_{as}$	asociační konstanta
LDL	cholesterol o nízké hustotě (LDL cholesterol)
LoD	mez detekce
LoQ	mez stanovitelnosti
LR	věřodnostní poměr
LRP-5	transmembránový ko-receptor z rodiny Lrp
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MetSy	metabolický syndrom
NaCl	chlorid sodný
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	dihydrogenfosforečnan sodný
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel (Adult Treatment Panel III)
NPR-C	receptor natriuretických peptidů typu C
OPD	<i>o</i> -fenylendiamin
Ostn	osteokrin
PBS	fosfátový pufr
PCOS	Syndrom polycystických ovárií
PEDF	pigmentový faktor odvozený od epitelu
P13K	Fosfatidylinositol 3-kináza
pNF-H	vysokomolekulární forma neurofilamentové podjednotky
PPAR $\gamma$	receptor aktivovaný proliferátory peroxozómů
pRSET	restrikční místo expresního vektoru
PSA	prostata-specifický antigen
PSP	prasečí spasmolytický polypeptid
PSP-94	prostatický sekreční protein 94
PTH	parathormon
QUICKI	kvantitativní index index rezistence k inzulínu
R	korelační koeficient
RAGE	Receptor pro pokročilé produkty glykace (AGE)
RAPPE	radikální prostatektomie pro karcinom
RARRES 2	respondér receptoru kyseliny retinoidové 2
RefSeq	přístupové číslo pro určitou sekvenci v genetické databázi
RF	revmatoidní faktor
SCGN	sekretagogin
SDS PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
Ser	serin
SML1	spasmolysin 1
SP	spasmolytický polypeptid
TAG	triacylglycerol
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-Tw	TBS - Tween
TFF1	trefoils (trojlístkový) protein 1



---

<b>Zkratka</b>	<b>Vysvětlení</b>
TFF2	trefoils (trojlístkový) protein 2
TFF3	trefoils (trojlístkový) protein 3
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor $\beta$
TIG2	chemerin (tazarotenem indukovaný gen-2)
TMB	tetrametylbenzidín
TRAP5b	kostní isoenzym kyselé fosfatázy 5a
UACL	buněčná linie
VILIP-1	visinin like protein-1
WC	objem pasu
Wnt	Wnt -signální dráha (rodina růstových faktorů zajišťujících homeostázu, regeneraci či embryonální vývoj organismu)

---

# 1. Teoretická část

## 1.1 ÚVOD

Diagnostika onemocnění hromadného výskytu (cluster chorob sdružujících se do tzv. metabolického syndromu, choroby skeletu, vybraná maligní onemocnění, atp.) je založena často na nepřímých a méně specifických vyšetřovacích postupech. V poslední době se do popředí dostává diagnostika těchto chorob pomocí laboratorních metod, které jsou charakteristické vysokou efektivitou stanovení. Ve své disertační práci jsem se zabýval stanovením vybraných ukazatelů v rámci onemocnění skeletu, metabolického syndromu, centrální mozkové soustavy či využitím pomocného ukazatele diagnostiky karcinomu prostaty.

### 1.1.1 Osteokrin (Ostn)

Osteokrin (musclin, Ostn) je protein o relativní molekulové hmotnosti 11,4 kDa, který podléhá proteolytickému štěpení na aktivní C-terminální peptid. Je produkován osteoblasty, buňkami kosterního svalu a vazivovými buňkami (Nishizawa H et al: 2004; Yasui A et al: 2007). Jde o nedávno objevený protein, který vykazuje vysokou homologii s natriuretickými peptidy, což umožňuje jeho vazbu na receptor natriuretických peptidů typu C (NPR-C) a inhibici jejich odbourávání (Liu Y et al: 2008; Moffatt P et al: 2007). Přesná funkce zatím nebyla objasněna, nicméně nedávné studie naznačují, že kromě stimulace diferenciaci osteoblastů (exprese Ostn v kostní tkáni se snižuje po přidání 1,25-dihydroxyvitaminu D3 a chronické přidání Ostn ke kostní tkáni vede k inhibici mineralizace, snížené expresi osteokalcinu a kostní alkalické fosfatázy) (Thomas G et al: 2003), může Ostn ovlivňovat energetický metabolismus a inzulinovou senzitivitu. Zdá se totiž, že buňky kosterního svalstva produkují řadu bioaktivních látek, které ovlivňují metabolismus podobně jako adipokiny. Na myších modelech bylo prokázáno, že se exprese Ostn (mRNA) v příčně pruhovaném svalu při hladovění snižuje a k jejímu opětovnému zvýšení dochází po obnovení příjmu potravy. Současně bylo zjištěno, že exprese Ostn se zvyšuje účinkem inzulinu a naopak k jejímu snížení dochází působením adrenalinu nebo isoproterenolu (Nishizawa H et al: 2004; Yasui A et al: 2007). Obézní myši s rezistencí na inzulin měly vyšší expresi Ostn, a lze tedy odvodit, že osteokrin by mohl být peptid, který vyvolává rezistenci k inzulinu (Nishizawa H et al., 2004; Yasui A et al: 2007; Moffatt P et al: 2007). V tomto kontextu je zajímavé, že Ostn snižuje

inzulinem stimulované vstřebávání glukózy svalovými buňkami, syntézu glykogenu v játrech a je pravděpodobné, že osteokrin působí na celou inzulinovou signalizační dráhu (Nishizawa H et al: 2004; Liu Y et al: 2008). Ačkoliv bylo nedávno provedeno několik studií, které hodnotily expresi genu *Ostn*, není stále dostupná komerční souprava pro stanovení koncentrace tohoto proteinu v biologických vzorcích. Ve většině publikací byl význam *Ostn* posuzován pomocí zvířecích genetických modelů (myši, krysy), případně na kulturách embryonálních lidských renálních buněk (HEK 293–Human Embryonic Kidney Cells).

Je možné, že tento protein by mohl hrát roli v diagnostice, ev. monitorování terapie osteopatií a při hledání vztahů mezi kostním a energetickým metabolismem.

### **1.1.2 Pigment epithelium-derived factor (PEDF)**

PEDF je multifunkční protein patřící do rodiny serpinů (serpiny - skupina inhibitorů serinových proteáz). Je syntetizován převážně v játrech, ledvinách, ale např. i v plicní, mozkové a tukové tkáni a vykazuje neurotrofické, gliastatické, antiangiogenní a antitumorogenní vlastnosti ovlivňující například diferenciační aktivitu buněk odvozených z retiny a CNS (Yang S et al: 2013). PEDF je silný inhibitor angiogeneze blokující fibrogenézi v ledvinách diabetiků prostřednictvím inhibice exprese a funkce růstového faktoru beta a růstového faktoru odvozeného z pojivové tkáně (Wang J J et al: 2006); in vitro snižuje poškození buněk endotelu, což by mohlo naznačovat jeho vliv v procesu vzniku aterosklerózy (Chen H et al: 2008). V buněčné kultuře u živočišných modelů PEDF inhibuje růst endoteliálních buněk, jejich migraci a suprimuje ischemií-vyvolanou neovaskularizaci (Yamagishi S et al: 2006).

Hlavním místem produkce PEDF jsou pravděpodobně játra, odkud se PEDF dostává do cirkulace (Yamagishi S et al: 2006). V menší míře je také PEDF produkován i tukovou tkání, nicméně i u jedinců s obezitou a inzulinovou rezistencí je zdrojem většiny PEDF v cirkulaci tuková tkáň (Moreno-Navarrete J M et al: 2013). Exprese PEDF v tukové tkáni je snížena během diferenciace adipocytů a zvýšena u obezity (Matsuzawa Y: 2006).

PEDF pravděpodobně hraje důležitou roli u obezitou indukované inzulinové rezistence (protektivní efekty) a dokonce bylo popsáno, že jeho koncentrace v séru by mohla být nezávislým ukazatelem inzulinové rezistence i u pacientů s esenciální hypertenzí (Nakamura K et al: 2008). V souvislosti s inzulinovou rezistencí byly zvýšené hodnoty PEDF v séru pozorovány i u neobézních žen se syndromem polycystických ovarii (Lecke S B et al: 2013).

Bylo prokázáno, že intracelulární PEDF se váže na adipocytární lipázu a vede k degradaci triacylglycerolů. Na základě těchto zjištění byla prezentována hypotéza, že snížení hladiny sérové koncentrace PEDF může přispět k rozvoji jaterní steatózy (Dai Z et al: 2013). Mnoho autorů prezentovalo, že oxidační stres a chronický zánět tukové tkáně přispívá k rozvoji metabolického syndromu. Zdá se, že PEDF svým antioxidačním a anti-inflamatorním účinkem snižuje riziko chronického zánětu cév, avšak dosud nebyl potvrzen jeho účinek při potlačení zánětu v tukové tkáni (Matsui T et al: 2014).

Ve studiích prováděných na non-kavkazské populaci bylo zjištěno, že koncentrace PEDF souvisí s rizikovými faktory aterosklerózy a rozvojem metabolického syndromu (Wang P et al: 2008; Yamagishi S et al: 2006; Yamagishi S et al: 2014).

Je možné, že by mohlo jít o potenciační ukazatel přítomnosti a závažnosti metabolického syndromu také u kavkazské populace.

### **1.1.3 Visinin like protein-1 (VILIP-1)**

Nedávno publikovaná studie prezentovala, že existuje více než 29 genů, jejichž produkty nacházíme v centrální nervové soustavě ve vyšší koncentraci (Laterza O F et al: 2006). Jedním z nich je právě VILIP-1 (Visinin like protein 1); jde o cytoplazmatický protein s nízkou relativní molekulární hmotností, který je téměř absolutně specifický pro CNS, vyskytuje se v mozku ve vysoké koncentraci nezávisle na lokalizaci a typu buněk (An W F et al: 2000; Branewell K H et al: 1999).

VILIP-1 je členem rodiny neuronálních senzoričkových kalciových proteinů (existuje VILIP-1/2/3), který účinkuje zvýšením koncentrace cAMP v buňkách; jeho funkční role není však zcela jasná a jde pravděpodobně o signální protein (spekuluje se o tom, že ve slinivce vede ke zvýšení sekrece inzulínu; v mozku zvyšuje expresi nikotinových acetylcholinových receptorů a v organismu obecně účinkuje jako „tumor supresor“ inhibicí buněčné proliferace, adheze a invazivity) (An WF et al: 2000; Burgoyne RD et al: 2004). Kromě toho VILIP-1 může být i jedním z prognostických ukazatelů, využitelných při diagnostice Alzheimerovy choroby (Hasegawa S et al: 2013) nebo demence způsobené Lewyho tělísky (Luo X et al: 2013).

Lze tedy obecně říci, že VILIP-1 náleží do rodiny proteinů, které se vyskytují v centrální nervové soustavě a podílejí se na mnoha fyziologických procesech, které zahrnují například modulaci bolesti, energetický metabolismus, myokardiální procesy či karcinogenezi. Na molekulární úrovni se tyto proteiny podílejí na kontrole neuronálních funkcí. (Buttgereit J et al: 2010; Gierke P. et al: 2008).

Mimo mozkovou tkáň se VILIP-1 vyskytuje také v pankreatu, kde působí ve funkci represorového genu pro inzulín a účinkuje pravděpodobně zvýšením sekrece inzulínu (Dai FF et al: 2006).

Z hlediska stanovení tohoto proteinu bylo popsáno pouze několik in-house diagnostických souprav, ne však metodou ELISA.

Až do níže uvedeného projektu, na kterém jsem se zúčastnil a popisují jej v rámci disertační práce, nebyla publikována studie, která by hodnotila koncentraci VILIP-1 u jedinců s ischemickou mozkovou příhodou.

### **1.1.4 Sekretagogin (SCGN)**

Sekretagogin (SCGN) je kalcium vázající protein o relativní molekulové hmotnosti 32 kDa (jedna molekula SCGN váže celkem čtyři vápenaté ionty vazbou o nízké afinitě) (Gyenqesi E et al: 2013; Rogstam A et al: 2007).

Tato bílkovina patří do rodiny EF-hand proteinů (spolu s parvalbuminem a kalretininem). SCGN byl nejdříve nalezen v  $\beta$ -buňkách Langerhansenových ostrůvků v pankreatu a následně byla jeho přítomnost detekována v různých částech centrální i periferní nervové soustavy včetně sítnice. Na animálním modelu byla popsána souvislost exprese SCGN v mozku i slinivce s koncentrací inzulínu a glukózy v cirkulaci (Weltzien F et al: 2014, Maj M et al: 2012).

Zdá se, že SCGN je multifunkční protein s mnohostranným účinkem, který se účastní pravděpodobně metabolismu neuronů, jejich diferenciaci, proliferaci, vezikulární exocytózy neuroaktivních látek; současně vykazuje neuroprotektivní účinky (Kosaka K et al: 2013).

SCGN je mimo slinivky exprimován převážně v CNS; zejména v mozečku, hypofýze a hypotalamu. Z toho vyplynul i náš předpoklad zda-li by SCGN nemohl sloužit jako laboratorní ukazatel pro odhad zralosti CNS nebo parametrů rozvoje či poškození CNS u novorozenců. Ke stanovení zralosti a stávajícího zdravotního stavu novorozence se totiž běžně využívá řada klinických (Apgar-skóre) i laboratorních testů (pH, laktát, S-100, atp.). Především pro odhad zralosti CNS, který může být zatížen bezprostředně po porodu chybou, se hledají další laboratorní ukazatele, které by mohly v budoucnu sloužit jako parametry rozvoje nebo poškození CNS.

### **1.1.5 Dickkopf-1 protein (Dkk-1)**

Podobně jako je tomu u onemocnění CNS jsou choroby skeletu obtížně diagnostikovatelné, a to především v jejich časných fázích. Tato latence může být z hlediska další prognózy choroby nebezpečná i pro svoji částečnou ireversibilitu. Jedním z potenciálních ukazatelů kostní remodelace by mohl být nedávno popsán Dickkopf-1 protein (Dkk-1).

Dkk-1 je rozpustný protein, který byl nedávno identifikován jako komponenta přenosu signálu parathormonu; současně jde o inhibitor signální kaskády Wnt/LRP5. Tato kaskáda je v lidském organismu pravděpodobně jednou z hlavních regulačních komponent osteogenetických i osteoresorpčních procesů. Díky tomu jej lze považovat za supresor kostní formace, který vede k poklesu kostní hmoty (experimentální modely).

Dkk-1 je exprimovaný především chondrocyty a inhibuje destrukci chrupavky při osteoartritidě tím, že je schopen inhibovat expresi katabolických faktorů zprostředkovanou Wnt, proto lze předpokládat možné terapeutické využití stanovení Dkk-1 v séru při léčbě osteoartritid (Oh H et al: 2012). Signální kaskáda Wnt hraje důležitou roli v rozvoji a regulaci buněčného růstu, proliferace a diferenciaci buněk, jejich přežívání a apoptóze. Ztráta regulace této signální dráhy může vést k rozvoji nádorového bujení. Velikost exprese Dkk-1 se liší podle histologického typu nádorů a je ovlivňována i mikroprostředím v tkáních (Jiang T et al: 2013; Sun Z et al: 2014).

Informace o významu Dkk-1 jsou však rozporuplné, protože některé autorské skupiny nenalezly vztahy mezi Dkk-1 v séru, parametry kostního obratu a stavem kostní hmoty (Cejka D et al: 2011; Pečina-Slaus N: 2010). Jiní autoři naopak prokázali, že produkce tohoto kostního cytokinu je v kosti silně zastoupena a jeho exprese se zvyšuje v místě fragilních zlomenin (D'Amelio P et al: 2011); zvýšené hodnoty Dkk-1 v séru byly nalezeny také u jedinců s vyšším kostním obratem (Liu Y Y et al: 2010; Glantschnig H et al: 2010).

Při zkoumání potenciální role Dkk-1 a TRAP5b (tartrate-resistance acid phosphatase 5b) u osob s dnovou artritidou byla zjištěna významně zvýšená hladina Dkk-1, která souvisela s koncentrací TRAP5b, což ukazuje také na možnou úlohu Dkk-1 při destrukci kostní tkáně u dnové artritidy (Zhao W et al: 2012).

Vzhledem k výše uvedenému je zajímavé, že souvislosti Dkk-1 se změnou density nebo kostními ukazateli byly popsány ojedinele a byly slabé (Long L et al: 2010).

Vyšší hladiny Dkk-1 v séru byly nalezeny v experimentech především u jedinců s maligními onemocněními metastazujícími do skeletu, karcinomem plic, kolorektálním karcinomem, u nádorů vaječníků, u osob s revmatoidní artritidou či systémovým lupus erythematoses (Garnero P et al: 2008; Liu Y Y et al: 2010; Voorzanger-Rousselot N et al: 2009; Tao J et al: 2009).

V poslední době se také objevují informace o vlivu protilátek proti Dkk-1 v léčbě osteoporózy (Tai N et al: 2014). Za zajímavou lze také považovat informaci o negativní souvislosti mezi koncentrací Dkk-1 a aterosklerotickými pláty u africko-americké populace diabetiků 2. typu (Register TC et al: 2013) Nedávno bylo dokonce popsáno, že koncentrace Dkk-1 by mohla být prediktorem vzniku akutního koronárního syndromu (Wang L et al: 2013).

## 1.1.6 Chemerin

Chemerin, známý také jako tazarotenem indukovaný gen 2 (TIG2) nebo respondér receptoru kyseliny retinoidové (RARRES2) se v organismu vyskytuje ve dvou formách. Jednak jako nativní protein o relativní molekulové hmotnosti 18 kDa a jednak jako jeho krátká forma o relativní molekulové hmotnosti 16 kDa, která vzniká odštěpením 5 až 10 aminokyselin na terminálním C-konci pomocí serinových proteáz a má výrazně vyšší biologickou aktivitu než nativní protein (Zabel BA et al: 2006). Zdroj cirkulujícího chemerinu je doposud nejasný. Chemerinová mRNA je nejvíce exprimována v tukové, jaterní a ledvinné tkáni (Goralski K B et al: 2007). Gen pro chemerin, který kóduje signální peptid je také exprimován řadou dalších buněk jako jsou endoteliální buňky a fibroblasty.

Chemerin působí jako prozánětlivý cytokin, který aktivuje buňky imunitního systému prostřednictvím vazby na receptor pro chemerin (ChemR23) (Bozaoglu K et al. 2007).

Expres chemerinu a jeho receptoru se zvyšuje během diferenciacie preadipocytů na adipocyty. Chemerin navozuje lipolýzu v diferenciovaných adipocytech a 3T3-L1 buňkách, stimuluje intracelulární uvolňování vápníku a inhibuje akumulaci cAMP (Roh S et al: 2007; Goralski K B et al: 2007; Wittamer V et al: 2003; MacDougald O A et al: 2007). Chemerin je produkován jako inaktivní pre-protein a následně je serinovou proteázou odštěpena C-terminální část pre-proteinu a vzniká aktivní chemerin přítomný v séru nebo plazmě.

Chemerin hraje pravděpodobně důležitou roli v časné fázi regulace diferenciacie a růstu adipocytů a ovlivňuje inzulinovou rezistenci.

Chemerin pozitivně koreluje s hodnotou BMI, inulinovou rezistencí, krevním tlakem, koncentrací triacylglycerolů a negativně koreluje s koncentrací adiponektinu a HDL cholesterolem (Aronis N K et al: 2014). Zvýšená hladina chemerinu byla nalezena u jedinců s centrálním typem obezity a u pacientů s nealkoholickou steatohepatitidou (Roman A A et al: 2012). Při hubnutí dochází ke snížení exprese chemerinu buňkami tukové tkáně a ke snížení koncentrace cirkulujícího chemerinu v krvi (Chakaroun R et al: 2012). Hladinu chemerinu také nepřímě ovlivňuje intenzita fyzické zátěže (Polyzos S A et al: 2014).

Nedávno byla prezentována práce o vlivu konzumace alkoholu na koncentraci chemerinu, přičemž se zdá, že u lidí má zvýšený přísun alkoholu za následek nárůst koncentrace chemerinu v séru i v bílé tukové tkáni, což by odpovídalo teorii, že konzumace nízkých dávek alkoholu má pro organismus profitabilní efekt (Ren R-Z et al: 2012). Na druhé straně práce jiných autorů prokázala, že pravidelná pohybová aktivita vedla k poklesu koncentrace chemerinu. Tento příklad ukazuje na fakt, že získávané informace jsou velmi často protichůdné (Neuparth MJ, 2013).

Recentní publikace prokázaly, že chemerin je mimo jiných tkání produkován i placentou a může hrát důležitou roli v regulaci metabolismu během těhotenství. Při porovnání koncentrace chemerinu v séru během gestace s ukazateli inzulinové rezistence bylo zjištěno, že koncentrace chemerinu v séru byla během pozdní fáze gestace významně zvýšená v porovnání s časnou fází gestace a negativně korelovala s koncentrací adiponektinu. Nebyla zjištěna žádná vazba s koncentracemi triacylglycerolů, celkového cholesterolu, LDL, HDL cholesterolu a inzulinu. Z tohoto důvodu se prozatím zdá diskutabilní využití stanovení chemerinu v diagnostice inzulinové rezistence během gestace (Garces M F et al: 2013). Je možné, že chemerin má u novorozenců jiný efekt a dokonce se spekuluje o tom, že jeho koncentrace by mohla být spojena s přítomností gestačního diabetu mellitu (Poppel MN et al: 2013).

Podle všech prezentovaných studií se zdá, že je menopauza spojena s redistribucí tukové tkáně a často s abdominálním typem obezity. Na základě těchto výsledků existuje předpoklad, že se hladiny chemerinu u žen v menopauze zvyšují. Nicméně v naší práci jsme zjistili, že koncentrace chemerinu nebyly u sledovaného souboru paradoxně závislé na hodnotách sexagenů ani na podávání hormonální substitute, a proto se domnívám, že nelze stanovení chemerinu pro diagnostiku přítomnosti metabolického syndromu u osob po menopauze použít (14).

### 1.1.7 Prostate secretory protein 94 (PSP-94)

PSP-94 je jeden ze tří predominantních proteinů, produkovaných prostatou a bývá nalezen v lidské seminální tekutině společně s prostatickým specifickým antigenem (PSA) a prostatickou isoformou kyselé fosfatázy. Je to neglykosylovaný protein skládající z 94 AMK o relativní molekulové hmotnosti 107 kDa a je také znám pod označením  $\beta$ -mikroseminoprotein nebo prostatický inhibin podobný protein. PSP-94 je syntetizován jako pre-protein složený ze 114 AMK zbytků a po proteolytickém odštěpení signálního proteinu o 20 AMK vzniká vlastní PSP-94 protein.

PSP-94 byl poprvé identifikován v semenné plazmě jako sekreční produkt epiteliálních buněk prostaty. Později byl PSP-94 nalezen také například v plicích a prsních epiteliálních buňkách. Bylo zjištěno, že PSP-94 má fungicidní účinky, které jsou inhibovány v přítomnosti vápenatých iontů. PSP-94 se výrazně uplatňuje v rozvoji benigní hyperplazie prostaty (BPH) a následně na vzniku karcinomu prostaty. Mechanismus vzniku BPH není zcela znám, nicméně se předpokládá infekce prostaty patogenem, primárně při sexuální aktivitě. Pokud je zachována sekrece PSP-94 s C-terminálním koncem, který má fungicidní účinky nedochází k výraznému zmnožení patogenu a nemoc přejde do svého chronického stavu, který přetrvává buď několik měsíců nebo po celý život. Tento stav je charakterizován zvýšeným počtem leukocytů v prostatické tekutině (Laurence M: 2013).



PSP-94 však není lokalizován pouze na epitel prostaty, ale je produkován i v respiračním a gastrointestinálním traktu (v největší míře je exprimován žaludeční sliznicí). V plazmě PSP-94 tvoří vysokoafinitní komplexy s PSP-94 vázajícím proteinem a s CRISP-3 proteinem (cysteine-rich secretory protein 3). Lze předpokládat, že tento protein ovlivňuje i apoptózu nádorových buněk prostaty. Jako u ostatních proteinů produkováných prostatou, je PSP-94 při nádorovém bujení uvolněn do krve a může být měřena jeho koncentrace v séru. Při rozvoji růstu nádorů prostaty ze stádia hormonálně závislého do stádia hormonálně nezávislého dochází k výraznému poklesu koncentrace tvořeného PSP-94, až do stavu postupného vymizení produkce PSP-94 u pokročilých metastázujících karcinomů prostaty.

Zdá se, že pokles v produkci PSP-94 by mohl být použit v klinické praxi jako prognostický ukazatel pro odlišení pacientů s agresivní metastázující formou karcinomu prostaty. Byla prokázána souvislost mezi koncentrací PSP-94 v séru a seminální plazmě, což podporuje potenciální využití stanovení PSP-94 v séru jako markeru sekreční funkce prostaty. (Shukeir N et al: 2004; Laurence M: 2013).

### **1.1.8 Trefoils factors (TFF proteiny, TFF-1; TFF-2; TFF-3)**

Skupina (rodina) trefoil faktorů patří mezi peptidy, které mají charakteristickou doménu tvořenou třemi smyčkami, které jsou umístěny vedle sebe (Thima et al: 2005). TFF-1 a TFF-3 mají pouze jednu tuto doménu. TFF-2 obsahuje tyto domény dvě. Struktura proteinů je evolučně stabilní a je odolná proti účinkům tepla nebo enzymatickému štěpení (Samson M H et al: 2008).

TFF-1 je považován za sekreční protein o relativní molekulové hmotnosti 6,5 kDa (dimer 14 kDa), který je tvořen pouze jednou trojlístkovou doménou, a který je nutný pro tvorbu dimerních struktur (tvoří homodimery nebo heterodimery s gastrokinem 2) (Kjelle S: 2009). Vysoká exprese TFF-1 byla nalezena mimo jin v průdušnici (Oertel M et al: 2001). TFF-2 je tvořen dvěma trojlístkovými doménami s velmi kompaktní strukturou způsobující jeho zvýšenou odolnost v prostředí gastrointestinálního traktu. TFF-3 protein je tvořen třemi trojlístkovými doménami, které obsahují sedm cysteinových zbytků. TFF-3 je exprimován převážně v buňkách střední sliznice, kde se podílí na udržování integrity mukózní vrstvy a tím chrání epitelové buňky před poškozením. Pokud je poškozena sliznice, kterou jsou tvořeny, dochází ke zvýšení jejich koncentrace, což přispívá k hojení sliznice a obnově daného epitelu. Jejich výskyt je ovšem spojený s různými zánětlivými stavy v těle, například u pacientů s Crohnovou chorobou dochází

ke zvýšení koncentrace TFF-1 a TFF-2 v séru (Vestergaard E M et al: 2004), a objevují se i při některých typech rakoviny.

Vysoká koncentrace TFF-1, TFF-2 a TFF-3 byla zjištěna u pacientů s rakovinou prostaty, ale i u jiných typů nádorů (nádory prsu, tlustého střeva a vaječníků) (Samson M H et al: 2008).

Doména je tvořena přes tři intramolekulární disulfidické můstky a charakterizuje ji tzv. „trojlístková“ struktura (Kinoshita K et al: 2000; Samson MH et al: 2008). Samotná doména obsahuje sekvenci 38 nebo 39 aminokyselin, ve kterých se nachází 6 zbytků cysteinu. Pravidelnost struktury je zachována rozestupem již zmíněných disulfidických můstků a to v 1-5, 2-4 a 3-6 konformaci (Thima L et al: 2005).

V rámci onkologické diagnostiky se ovažuje o všech 3 trefoils proteinech, které patří do rodiny minimálně tří příbuzných nízkomolekulárních peptidů (Thima et al: 2005). Struktura proteinů je evolučně stabilní a je odolná proti účinkům tepla nebo enzymatickému štěpení (Samson M H et al: 2008). Doména obsahuje tři intramolekulární disulfidické můstky a charakterizuje ji tzv. „trojlístková“ struktura (Kinoshita K et al: 2000; Samson M H et al: 2008). Disulfidické vazby jsou tvořeny mezi šesti cysteinovými zbytky.

### **1.1.9 S100A-11**

S100A-11 (někdy označovaný i S100C) patří do rodiny proteinů S100, které ve své molekule obsahují dva vápník vázající EF-hand motivy. Polypeptidový řetězec se skládá ze 105 aminokyselinových zbytků o relativní molekulové hmotnosti 17,74 kDa. S100A-11 se může v závislosti na iontové síle vyskytovat jak v monomerní, tak homodimerní formě. Poprvé byl izolován z buněk hladké svaloviny kuřecího žaludku. Lidský homolog byl později izolován jak z buněk zdravé kolorektální sliznice, tak i z buněk kolorektálního karcinomu, s mnohem vyšší expresí v nádorových buňkách (Tanaka M et al: 1995). V molekule S100A-11 může být fosforylována aminokyselina threonin (T10), což má za následek významné změny ve struktuře molekuly proteinu (Kouno T et al: 2008).

Proteiny rodiny S100 hrají roli v regulaci řady buněčných procesů. Snížením exprese S100A-11 dochází k destabilizaci proteinu p21 prostřednictvím negativní regulace fosfatidylinozitol 3-kinázy a aktivaci glykogensyntázy kinázy 3 (Foertsch F et al: 2013). Jednotlivé proteiny typu S100 jsou přítomny v řadě specifických tkání a ovlivňují řadu specifických nemocí včetně karcinomů (mimo jiné i indukci apoptózy; Makino et al: 2004). V závislosti na lokalizaci nádoru se může exprese S100A-11 zvyšovat buď při potlačení nádorového bujení (nádory močového měchýře nebo nádory ledvin; Memon A A et al: 2005) nebo naopak snižovat při jeho rozvoji

(nádory prostaty, prsu a pankreatu (Rehman I et al: 2004). Exprese S100A-11 děložní sliznici ovlivňuje, prostřednictvím regulace koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce, aktivaci EGFR, což může hrát důležitou roli při implantacích embrya při podání exogenního EGF (Liu X M et al: 2012).

### 1.1.10 Metabolický syndrom (MetSy)

Definice metabolického syndromu podle NCEP ATP III (*National cholesterol education program adult treatment panel III*, Executive Summary of the Third Report. JAMA 2001). Při přítomnosti tří nebo více z uvedených pěti rizikových faktorů se jedná o metabolický syndrom:

- obvod pasu  $\geq 102$  cm u mužů a  $\geq 88$  cm u žen
- hladina triacylglycerolů ( $\geq 1,7$  mmol/l)
- HDL-cholesterol ( $\leq 1,0$  mmol/l u mužů a  $\leq 1,3$  mmol/l u žen)
- zvýšený krevní tlak ( $\geq 130/85$  mm/Hg)
- zvýšená glykémie na lačno ( $\geq 5,6$  mmol/l)

## 1.2 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

### 1.2.1 Obecný úvod

Základem imunochemických metod je využití *in vitro* reakce protilátka – antigen. Využívá se přitom schopnosti protilátek vázat se na široké množství sloučenin, buněk i virů, které se chovají jako antigeny, specifity protilátky pro reagující látku a síly vazby protilátky s antigenem (Thomas L: 1998).

#### Antigen

Antigen je jakákoli látka, se kterou specificky reaguje protilátka. Jsou to makromolekulární látky, jejichž přítomnost v organismu stimuluje tvorbu protilátek, respektive navozuje specifickou imunitní odpověď(Thomas L: 1998).

Antigeny mají různou chemickou strukturu. Malá oblast molekuly rozeznávající imunitní receptory se nazývá epitop. Komplexy vzniklé díky vazbě antigenu s protilátkami a s komplementovými fragmenty se nazývají imunokomplexy (Thomas L: 1998).

Antigen může být buď kompletní (imunogen) nebo nekompletní (hapten).Imunogen je charakterizován imunogenicitou a specificitou (*imunogenicitá*–schopnost navodit imunitní odpověď;*specificita*–schopnost reagovat pouze s protilátkami a lymfocyty jejichž tvorbu daný imunogen vyvolal).Hapten je nízkomolekulární sloučenina ( $M_r < 2000$ ), která je schopná

specifické vazby na protilátky, ale není schopna vyvolat imunitní odpověď. Hapten je tedy pouze část kompletního antigenu (např. některá léčiva, resp. jejich metabolity, nízkomolekulární hormony nebo některé peptidy) (Thomas L: 1998).

Každý antigen je složen z makromolekulárního nosiče a nízkomolekulárních determinantních skupin tzv. epitopů. Epitop je tvořen 5-8 AMK nebo monosacharidovými jednotkami, které se strukturálně nacházejí blízko u sebe. Různé antigeny obsahují různé antigenní determinanty, kdy každá změna AMK nebo monosacharidu vyvolává tvorbu odlišných protilátek. Schopnost protilátek rozlišovat rozdíly epitopů je základem specifity imunitních reakcí. Aby imunogen vyvolal tvorbu protilátek musí splňovat některé fyzikální ( $M_r > 10000$ , rozpustnost, elektrický náboj, konformační struktura, dostupnost epitopů), chemické (mezi nejsilnější imunogeny patří proteiny a polysacharidy; imunogenicita lipidů stoupá s vazbou s proteiny nebo polysacharidy) a biologické (genetická odlišnost – čím větší rozdíl mezi zdrojem antigenu a příjemcem, tím větší bude jeho imunogenicita) (Thomas L: 1998).

### **Protilátky**

Protilátky (angl. *antibody*, *Ab*) jsou to glykoproteiny a patří mezi imunoglobuliny. Tvoří se v plazmatických buňkách, které vznikají z B-lymfocytů po jejich stimulaci specifickým antigenem jako součást imunitní odpovědi. V humorálním imunitním systému mají dvě hlavní funkce. První je protilátková specifita, tzn. rozpoznání a vazba s komplementární antigenní determinantou a druhá je biologická výkonná (efektorová) funkce. Při provádění imunoanalytických metod se k detekci analytu využívá jedna nebo několik specifických protilátek (Thomas L: 1998).

Podle jejich fyzikálně-chemických a biologických vlastností rozlišujeme několik typů protilátek a dělíme je do pěti tříd IgG, IgM, IgA, IgD nebo IgE.

Všechny třídy imunoglobulinů mají podobnou strukturu, skládají se z dvou lehkých řetězců (L) a dvou těžkých řetězců (H). Lehké řetězce jsou vázány disulfidovými vazbami k těžkým řetězcům, které jsou mezi sebou rovněž vázány disulfidovými vazbami (Thomas L: 1998).

Lehké řetězce (L) mají variabilní (VL) a konstantní (CL) část. Rovněž těžké řetězce (H) mají část variabilní (VH) a konstantní (CH). Variabilní části jsou tvořeny vždy 100 až 110 aminokyselinovými zbytky na N-konci řetězců. Sekvence aminokyselin ve variabilních částech lehkých řetězců určují specifitu protilátky a vytvářejí vazebné místo pro určitou antigenní determinantu - paratop (Thomas L: 1998).

Podle charakteru a způsobu přípravy dělíme protilátky na polyklonální a monoklonální. Polyklonální protilátky se připravují cílenou imunizací zvířat. Je to nehomogenní směs protilátek různé afinity a specifity, vytvořené v organismu jako

odpověď na imunogen. Polyklonální protilátka může reagovat s několika antigenními determinantami (Thomas L: 1998).

Monoklonální protilátky jsou produkovány buněčnou kulturou, kdy se ze sleziny imunizovaného zvířete získají lymfocyty produkující protilátky a tyto lymfocyty jsou následně hybridizací fúzovány s myelomovými buňkami za vzniku hybridomů. Selekcí hybridomů (klonováním) jsou vybrány ty klony, které produkují požadované protilátky proti vybrané antigenní determinantě antigenu. Takto syntetizovaná protilátka je homogenní, s jediným typem vazebného místa a rozeznává tak pouze jednu antigenní determinantu (Thomas L: 1998).

Polyklonální protilátky mají při porovnání s monoklonálními protilátkami vyšší citlivost, vyšší aviditu, menší počáteční náklady a neinterferují s HAMA. Mezi jejich nevýhody patří nutnost purifikace protilátky, velké rozdíly v kvalitě vlivem individuální imunologické odpovědi. Výhodou monoklonálních protilátek je zejména jejich vyšší čistota a specifita, dlouhodobá produkce a jsou dostupné ve velkém množství v nezměněné kvalitě, nedochází ke zkříženým reakcím a rozeznávají pouze jeden epitop. Naopak monoklonální protilátky jsou v počáteční fázi výroby finančně náročnější, mají nižší afinitu, možnost HAMA interference imunologické odpovědi (Thomas L: 1998).

Rekombinantní protilátky jsou protilátky jejichž příprava je založena na izolaci genů kódujících protilátky, na jejich klonování a expresi. Mezi jejich výhody patří rychlejší příprava oproti monoklonálním protilátkám, mají vyšší afinitu a specifitu s možností další modifikace vazebných vlastností protilátek (Káš J: 2006).

Vlastnosti každé protilátky můžeme charakterizovat afinitou, aviditou nebo její specifitou pro daný antigen.

### **Afinita**

Afinita charakterizuje sílu vazby protilátky s jednou antigenní determinantou antigenu a vyjadřuje míru síly interakce mezi antigenem a protilátkou a lze ji kvantitativně vyjádřit pomocí asociační konstanty ( $k_{as}$ ) reakce. Kvalitní protilátky používané pro účely imunoanalýzy by měly mít  $k_{as} = 10^{10} - 10^{12} \text{ mol}^{-1}$  (Thomas L: 1998).

### **Avidita**

Avidita vyjadřuje vazebnou energii mezi celou molekulou antigenu a protilátkou. Avidita je závislá na afinitě, ale bere v úvahu valenci antigenu a protilátky i nespécifické faktory (multivalenční interakce), které mohou ovlivňovat vazby mezi antigenem a protilátkou. Vyjadřuje afinity všech vazebných míst

na všech protilátkách přítomných v antiséru a všech antigenních determinant přítomných na makromolekulách. Například u IgM mají vazebná místa pro antigen stejnou afinitu jako pro IgG, ale pro multivalenční antigen budou mít vyšší aviditu jak IgG, protože mají více vazebných míst a větší molekulu a tím i větší schopnost vázat antigen (Thomas L: 1998).

### **Specifita**

Specifita protilátky je charakterizována minimální interferencí s jinými látkami, než je látka, pro jejíž stanovení je určena. Mírou specifity protilátky je procento zkřížené reakce s látkou, pro jejíž stanovení není určena. Mezi nespecifické faktory řadíme např. interakce jiných částí molekul, než je vazebné místo protilátky a antigenních determinant (Thomas L: 1998).

### **Křížová reaktivita**

Pokud mají dva antigeny dva shodné nebo strukturně podobné antigenní determinanty, mají protilátky vytvořené proti jednomu z nich tendenci reagovat také s druhým antigenem, respektive je to reakce protilátky s jiným antigenem, než který vyvolal její tvorbu v důsledku podobných antigenních determinant. Homologní antigen je ten, který byl použit k vyvolání tvorby protilátek a heterologní antigen je antigen s danou protilátkou křížově reagující (Thomas L: 1998).

### **Ligand**

Ligand je látka (biomolekula, antigen) nebo její část schopná vazby na specifický receptor (enzym, protilátka) za vzniku komplexu. Síla vazby ligandu ke svému receptoru se vyjadřuje afinitou, což je disociační konstanta komplexu ligand-receptor (Thomas L: 1998).

### **Vazebná kapacita**

Vazebná kapacita vyjadřuje kapacitu receptoru (např. protilátky) vázat se na ligand (např. antigen) (Thomas L: 1998).

### **Heterofilní protilátky**

Heterofilní protilátky jsou protilátky proti imunoglobulinům různých živočišných druhů. Mezi heterofilní protilátky řadíme i HAMA (lidské anti-myší protilátky) obsažené v lidském séru, které mohou reagovat s myšími monoklonálními protilátkami používanými v imunoesejích, kde mohou interferovat např. vazbou na protilátku imobilizovanou na mikrodestičce, čímž dojde ke změně

v konformaci vazebných míst a zablokování vazebných míst na protilátce pro stanovovaný antigen (Thomas L: 1998).

### **Revmatoidní faktor (RF)**

RF jsou IgM protilátky se specifitou proti Fc fragmentu lidského IgG a mohou ovlivňovat průběh imunostanovení podobně jako heterofilní protilátky. RF mohou být ze vzorku odstraněny přidáním reagensie obsahující protilátky proti lidskému IgG s následnou centrifugací (Thomas L: 1998).

### **Hook efekt**

Hook efekt je důsledkem saturace vazebných míst značené protilátky vysokými koncentracemi antigenu, kdy se přebytečný antigen váže na volnou značenou protilátku, která tak nemůže tvořit komplex antigen-protilátka a vytvářet sendvičové uspořádání. Vlivem hook efektu je výsledek stanovení nižší než je skutečná koncentrace antigenu ve vzorku a způsobuje tedy pokles signálu při zvýšení koncentrace antigenu (Thomas L: 1998).

### **Tvorba imunokomplexu**

Antigen reaguje reverzibilně s protilátkou za vzniku komplexu protilátka-antigen (imunokomplexu):  $Ab + Ag \leftrightarrow AbAg$ . Vazba v komplexu je nekovalentní za účasti hydrofobních vazeb, vodíkových můstků, van der Waalových sil a interakce iontů. Rychlost vzniku imunokomplexů se snižuje při  $pH < 7$ , se zvyšující se iontovou silou a s rostoucí teplotou. Velikost imunokomplexu a jeho rozpustnost závisí na poměru počtu epitopů a antigenních molekul k počtu dostupných vazebných míst na protilátkách v reakční směsi (Thomas L: 1998).

Pokud je počet vazebných míst na protilátkách výrazně vyšší než je počet epitopů, dochází k rychlému nasycení antigenu protilátkou ještě předtím, než je vytvořen imunokomplex – oblast nadbytku protilátky (Thomas L: 1998).

Pokud je počet vazebných míst na protilátkách v mírném nadbytku nebo v ekvivalenci k počtu epitopů dochází k tvorbě nerozpustného imunokomplexu – zóna ekvivalence (Thomas L: 1998).

Pokud je počet vazebných míst na protilátkách výrazně nižší než je počet epitopů, dochází ke vzniku malých rozpustných imunokomplexů, z důvodu omezených vazebných možností antigen-protilátka – oblast nadbytku antigenu (Thomas L: 1998).

## 1.2.2 Základní dělení (Mančal P: 1987, Wild D et al: 2013)

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je test, který řadíme mezi heterogenní enzymové imunoanalýzy. Slouží k detekci a kvantifikaci antigenů, protilátek a haptenu. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů. Jednak schopnosti proteinů (tedy i imunoglobulinů) vázat se na povrch umělých hmot (např. polystyrenu) a dále pak schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty svých molekul.

Heterogenní enzymoanalýza vyžaduje, na rozdíl od homogenní, oddělení značené reagentie vázané v imunokomplexu od volné. Nejčastěji se používá imobilizace jednoho z partnerů reakce na pevné fázi a oddělování volné a vázané reagentie pomocí promytí promývacím roztokem.

Mezi nejběžněji používané varianty ELISA patří: přímá ELISA, nepřímá ELISA a sendvičová ELISA.

### Přímá ELISA

Může sloužit k důkazu antigenů i protilátek. Neznačený antigen/protilátka je imobilizován na pevnou fázi (nejčastěji na povrch jamek mikrotitračních destiček) a po inkubaci a promytí je do reakční směsi přidána značená protilátka/antigen, která se váže na imobilizovaný antigen/protilátku. Následně dochází k oddělení nenavázaných protilátek/antigenů promytím, po kterém se do směsi přidá vhodný substrát a po proběhnutí enzymatické reakce je přidáno stop činidlo a následuje spektrofotometrická detekce. Koncentrace analytu se vyhodnocuje z kalibrační křivky, která je sestavena vynesáním závislosti absorbance kalibrátorů oproti jejich známé koncentraci (kalibrátory jsou analyzovány společně se vzorky).

Přímá ELISA může být buď kompetitivní nebo nekompetitivní.

Kompetitivní ELISA má dvě varianty - s imobilizovanou protilátkou nebo s imobilizovaným antigenem. Princip lze vysvětlit na příkladu stanovení antigenu ve vzorku, kdy je protilátka, která je přítomna v omezeném množství, imobilizována na povrchu jamek mikrotitrační desky. O její vazebná místa soutěží značený antigen, který je v mírném přebytku, s antigenem neznačeným, který je stanovovaným vzorkem. Množství komplexu se značeným antigenem je nepřímo úměrné množství stanovovaného neznačeného antigenu (čím vyšší je koncentrace antigenu ve vzorku, tím méně značeného antigenu bude navázáno na imobilizovanou protilátku a tím nižší bude intenzita měřeného signálu (intenzita zbarvení reakční směsi). Nespecifické vazby protilátek mohou být zablokovány např. pomocí roztoku 0,5% BSA. Této techniky se především používá při kvantifikaci nízkomolekulárních látek, které se snadno připraví velmi čisté a v dostatečném množství, a které mají omezené množství vazebných míst pro protilátku, takže nelze použít sendvičovou techniku.



Nekompetitivní ELISA používá primární protilátku v nadbytku. Reakce se účastní pouze jeden antigen a tím je analyzovaná látka. Komplex protilátka-antigen je kvantifikován pomocí sekundární protilátky, která je konjugovaná s enzymem. Po promytí a přidání substrátu je směs inkubována a vlivem enzymatické reakce dochází k zbarvení reakční směsi. Po zastavení reakce a spektrofotometrické detekci je koncentrace analytu ve vzorku vyhodnocena z kalibrační křivky. Intenzita zbarvení (absorbance) je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

Přímá ELISA je jednoduchá provedením, ale její nevýhodou je nízká citlivost a velmi omezený výběr primárních protilátek.

### **Nepřímá ELISA**

V tomto uspořádání se na imobilizovaný antigen váže neznačená primární protilátka (stanovovaný analyt) a její nadbytek je po inkubaci odstraněn promytím. V dalším kroku je přidán konjugát (sekundární protilátka s navázaným enzymem), který se váže na primární neznačené protilátky. Nenavázaný konjugát je opět z reakční směsi odstraněn promytím. Po přidání substrátu dochází během inkubace k enzymatické reakci a k přeměně substrátu na barevný produkt, který je po zastavení reakce detekován spektrofotometricky. Koncentrace analytu ve vzorku je vyhodnocena z kalibrační křivky a je přímo úměrná změřené absorbanci (intenzitě zbarvení roztoku). Podmínkou spolehlivosti tohoto typu ELISA je, že sekundární protilátka neváže imobilizovaný antigen ani nepřilne na stěny mikrotitrační desky.

### **Sendvičová ELISA**

Sendvičová imunoanalýza patří mezi nekompetitivní ELISA a může být sestavena jak pro detekci antigenu, tak i pro detekci protilátky, které jsou imobilizovány na pevné fázi a musí být v nadbytku vzhledem k analyzované látce.

#### Sendvičová analýza pro stanovení antigenu

Využívá pro kvantitativní stanovení daného analytu dvě specifické protilátky proti tomuto analytu. První protilátka (vazebná protilátka) je imobilizována na mikrotitrační desce a následně inkubována se vzorkem. Po promytí je k imobilizovanému komplexu protilátka analyt přidána druhá (detekční) protilátka za vzniku sendvičového uspořádání. Detekční protilátka může, ale nemusí být značená enzymem (např. HRP). V případě, že detekční protilátka není značená, je potřeba do reakční směsi přidat třetí protilátku, která je specifická proti detekční protilátce značenou enzymem. V případě, že detekční protilátka je značená biotinem je nutno po odstranění nenavázané biotinylované protilátky promytím přidat streptavidin konjugovaný s enzymem, kdy dojde k vazbě mezi biotinem

a streptavidinem (eventuálně s biotinem). V některých případech může být detekční protilátka přímo značená enzymem. Poté je do reakční směsi přidán substrát, který reaguje s enzymem navázaným v sendviči. Enzymatická reakce je poté zastavena přidáním roztoku kyseliny sírové a intenzita zbarvení roztoku je detekována spektrofotometricky při dané absorbanci. Velikost absorbance je úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

V tomto uspořádání lze kombinovat vazebnou a detekční protilátku několika následujícími způsoby:

- shodné specifické polyklonální protilátky z jednoho živočišného druhu
- použití specifických polyklonálních protilátek ze dvou živočišných druhů
- použití specifické polyklonální protilátky a jedné monoklonální protilátky
- použití dvou monoklonálních protilátek proti různým epitopům
- použití dvou monoklonálních protilátek proti stejnému epitopu v případě detekce dimeru

Velkou výhodou této techniky je, že nemusí být k dispozici značený čistý antigen jako u kompetitivní techniky. Další výhodou je snadná optimalizace, neboť pevná fáze se protilátkou nasýtí a nemusí se stanovovat její optimální koncentrace. Protilátky musí ovšem být dostatečně specifické a musí mít vysoký titer. Pro vazbu protilátky na pevnou fázi je nutné používat protilátky jiného živočišného druhu (se stejnou specifitou) než je protilátka značená, aby se zabránilo možným nescifickým interakcím. Pokud použijeme jednu protilátku monoklonální a druhou polyklonální musí stanovený antigen obsahovat minimálně dvě vazebná místa pro protilátku.

### Sendvičová analýza pro stanovení protilátek

Využívá se především pro detekci specifických sérových protilátek proti virům a parazitům, autoprotilátek a specifických protilátek IgE proti jednotlivým alergenům. Antigen vázaný na pevnou fázi reaguje s testovanou protilátkou a po promytí se aplikuje druhá protilátka proti lidským imunoglobulinům značená enzymem. Značené protilátky mohou být namířeny proti jednotlivým imunoglobulinovým třídám (IgG, IgA, IgM či IgE). Vyšetření IgM protilátek v některých případech znemožňují vysoké koncentrace IgG protilátek stejné specifity, které soutěží o vazbu na antigen nebo přítomnost revmatoidních faktorů. Další postup je podobný jako v případě stanovení antigenů. Značená protilátka nesmí reagovat s protilátkou ve vzorku bez přítomnosti antigenu a nesmí také vytvářet nescifickou vazbu s pevnou fází.

## Enzymy a chromogeny

Pro výběr enzymů vhodných pro testy ELISA platí několik zásad:

- enzym musí mít malou molekulovou hmotnost
- musí být schopen vazby na protilátku a různé funkční skupiny antigenů
- musí zachovávat svou enzymovou aktivitu po vazbě na antigen nebo protilátku
- musí být stabilní
- musí mít vysokou enzymovou aktivitu
- reakční produkt enzymatické reakce musí být barevný nebo jinak snadno detekovatelný
- nesmí se vyskytovat v tělní tekutině, ve které je prováděno vyšetření

Enzym je kovalentně vázán neboli konjugován na protilátku, antigen nebo avidin/streptavidin. Mezi enzymy využitelné v ELISA testech se spektrofotometrickou detekcí patří zejména křenová peroxidáza a alkalická fosfatáza.

Křenová peroxidáza (HRP, horseradish peroxidase) má relativní molekulovou hmotnost 40 kDa a její aktivní skupinou je protohemin IX ( $\text{Fe}^{3+}$  vázané čtyřmi substituovanými pyrolovými kruhy). Substrátem pro peroxidázu je obvykle peroxid vodíku, ze kterého se účinkem enzymu uvolňuje kyslík, který následně oxiduje bezbarvý chromogen za vzniku barevného reakčního produktu. Mezi nejběžnější používané chromogeny patří *TMB* (3,3', 5,5'- tetramethylbenzidin). Během reakce vzniká modře zbarvený produkt, který po přidání zastavovacího roztoku změní barvu na žlutou s maximem absorbance při 450 nm. Mezi další substráty využitelnými pro reakce s křenovou peroxidázou patří ABTS (2,2' azino-bis-(3-etylbenzthiazolin-6-sulfonát) nebo OPD (o-fenylendiamin). Malá velikost HRP umožňuje molekule připojení na protilátku nebo avidin a tím zesílení výsledného signálu. HRP může být použita v reakci z různými substráty, je stabilnější a levnější než AP.

Alkalická fosfatáza (AP) má relativní molekulovou hmotnost 100 kDa. Stejně jako křenová peroxidáza patří mezi metaloproteiny a ve své molekule obsahuje dva ionty  $\text{Zn}^{2+}$ ). Pro alkalickou fosfatázu je nejvíce používaným substrátem *p*-nitrofenylfosfát, který se účinkem enzymu štěpí na žlutý *p*-nitrofenol s maximem absorbance při 405 nm.

V případě ELISA testu sendvičového provedení pro detekci antigenu může být enzym navázan na sekundární protilátku (konjugát), která se specificky váže na stanovený antigen.

## **Biotin – avidinový systém**

Použití tohoto systému zvyšuje citlivost celkové reakce a umožňuje zkrácení inkubačních časů.

Biotin je ve vodě rozpustný vitamin, který lze navázat na antigeny i protilátky (např. pomocí N-hydroxysuccinimidové metody). V případě vazby na makromolekulu je vhodné biotin vázat přes *spacer*, aby byl reakci s avidinem lépe přístupný.

Avidin je glykoprotein z vaječného bílku o relativní molekulové hmotnosti 67 kDa. Skládá se ze čtyř identických podjednotek. Každá podjednotka váže jednu molekulu biotinu. Reakce avidinu s biotinem je prakticky ireverzibilní vzhledem k vysoké asoiační konstantě. Avidin je stabilní v širokém rozmezí pH a teplot.

Streptavidin byl izolován z bakterie *Streptomyces avidinii*. Skládá se ze čtyř podjednotek. Každá podjednotka váže jednu molekulu biotinu.

Jak streptavidin, tak avidin jsou schopny vazby na molekulu biotinu. Disoiační konstanta této vazby je  $10^{-15}$ M. Proti avidinu má streptavidin zejména výhody v tom, že neobsahuje ve své molekule cukernou složku a nemůže tak nespecificky reagovat např. s lektiny. Avidin má hodnotu izoelektrického bodu okolo neutrálního pH 10 a proto snáze váže molekuly kyselější povahy (nukleové kyseliny, fosfolipidy), kdežto izoelektrický bod streptavidinu je blízko neutrálního pH.

## **Detekce enzymatických imunoanalýz**

Spektrofotometrická detekce je nejrozšířenější typ detekce u ELISA testů. Principem detekce je zeslabení intenzity světelného toku monochromatického světla zbarveným roztokem produktu enzymatické reakce. Nejčastěji jsou pro měření využívány vlnové délky 450 nm a 405 nm při použití referenční vlnové délky kolem 620 nm.

### **1.2.3 Analytická charakteristika ELISA souprav**

Pro ověření analytických charakteristik ELISA souprav jsme vypracovali validační plán, při jehož tvorbě jsme vycházeli z doporučení ČSKB pro provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích (Friedecký B: 2011) a ze standardů (tzv. podnikové normy v systému řízení) spolupracující komerční společnosti, která vyvíjí diagnostické ELISA soupravy pro vědu a výzkum ([www.biovendor.com](http://www.biovendor.com)). Byly ověřovány následující parametry:

#### **Mez detekce (*LoD*)**

Mez detekce metody je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno, je to tedy úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku odlišit od odezvy slepého pokusu (blank). Měření se provádí minimálně změření 16 vzorků

blanku. Jako blank je použit ředící roztok dané ELISA soupravy. Mez detekce je definována jako koncentrace analytu mající absorbanci větší než je průměrná absorbance blanku + 3× směrodatná odchylka blanku:  $A_{\text{blank}} + 3 \times SD_{\text{blank}}$ . Vypočítaná hodnota absorbance se poté odečte z kalibrační křivky.

### **Mez stanovitelnosti ( $LoQ$ )**

Mez stanovitelnosti se vypočte podle vzorce:  $LoQ = LoD \times \text{diluční faktor}$  vzorku.

### **Specifita**

Vzorky jsou testovány se zvířecími séry vybraných živočišných druhů na křížovou reaktivitu. Testování se provádí na myším, krysím, křeččím (morčecím), králíčím, ovčím, kozím, prasečím, hověžím, koňském, psím, kočičím a opičím (Rhesus monkey) séru.

Měření se provádí dle návodu k použití příslušné ELISA soupravy. Ředění měřených vzorků se provede dle doporučeného ředění sér, který je uveden v návodu k použití příslušné ELISA soupravy a k tomu referenční ředění 3× (pokud se tak séra již neředí). V případě doporučeného ředění sérových vzorků do ELISA, které je 60× a více, se jako referenční ředění použije ředění 20× nižší než ředění doporučené.

Stanovované zvířecí sérum křížově reaguje v případě vyhovující diluční linearitě. Pokud nebyla pozorována žádná křížová reaktivita má daná ELISA souprava vysoký stupeň specifity.

### **Preciznost**

Preciznost popisuje, jak blízko sebe jsou výsledky opakovaných měření stejného vzorku.

#### *Opakovatelnost (intra-assay)*

Preciznost měření za souboru podmínek opakovatelnosti měření.

Podmínka opakovatelnosti měření zahrnuje stejný postup měření, stejný obslužný personál, stejný měřicí systém, stejné pracovní podmínky a stejné místo, a opakování měření na stejném nebo podobných objektech v krátkém časovém úseku. Vyjadřuje stupeň shody mezi stanovovanými vzorky v rámci jednoho měření (tj. na jedné desce, v jedné šarži) a vyjadřuje se pomocí variačního koeficientu (CV) v %. Opakovatelnost se stanovuje v jedné šarži, na jedné desce, nejméně na dvou vzorcích. Koncentrace vzorků by měly pokrývat rozsah kalibrační křivky. Vzorky se ředí a jejich koncentrace stanoví podle návodu k příslušné ELISA soupravě, každý vzorek se pipetuje minimálně do osmi jamek. Vyjadřuje se jako variační koeficient v sérii v %. Opakovatelnost je považována za vyhovující, jestliže je variační koeficient  $\leq 15\%$ .

### *Mezilehlá preciznost (Inter-assay)*

Preciznost měření za souboru podmínek mezilehlé preciznosti měření.

Podmínka mezilehlé preciznosti měření zahrnuje stejný postup měření, stejné místo a opakování měření na stejném nebo podobných objektech v rozšířeném časovém úseku, ale může obsahovat další podmínky zahrnující změny. Vyjadřuje stupeň shody mezi stanovovanými vzorky v rámci několika měřeních (tj. na více deskách stejné šarže, stanovení jsou provedena ve více dnech).

Mezilehlá preciznost se stanovuje v jedné šarži, nejméně na dvou vzorcích. Koncentrace vzorků by měly pokrývat rozsah kalibrační křivky. Vzorky se řadí a jejich koncentrace se stanovuje podle návodu k příslušné ELISA soupravě. Měření se opakuje nejméně 5× a to v pěti různých dnech. Vyjadřuje se jako variační koeficient v % vypočítaný z průměru koncentrací daného vzorku, naměřených v jednotlivých testech. Mezilehlá preciznost je považována za vyhovující, jestliže je variační koeficient  $\leq 15\%$ .

### **Vychýlení (BIAS)**

Charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou. Ověřuje se vnitřní kontrolou kvality ověřenou koncentrací nebo použitím vhodného referenčního materiálu. Stanovení se provede podle návodu k příslušné ELISA soupravě.

### *Zpětný výtěžek*

Výtěžnost udává poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě.

Do vzorků séra se přidá definované množství standardu ve třech různých hladinách přidavku a poté se stanoví jeho celková koncentrace dle návodu k použití příslušné ELISA soupravy.

Přídavek analytu musí být minimálně polovina koncentrace naměřená ve vzorku tj. např. v séru byla naměřena koncentrace 5,0 mg/l, tudíž přídavek musí být v koncentraci 2,5 mg/l a více. Doporučené přídavky analytu: 0,5×; 1× a 2× koncentrace vzorku. Součet koncentrace séra a přídavku analytu by neměl přesahovat hodnotu druhého nejvyššího standardu.

Vyhodnocuje se poměr koncentrace naměřené/očekávané a musí se pohybovat v rozmezí 80-120% vzhledem k očekávané koncentraci.

Pro zjednodušení práce je, pokud možno, lépe používat jako přídavek standard, který je součástí soupravy (kalibrační křivky).

*Příklad:* použijeme vzorek naředěný 10× (např. 20  $\mu$ l + 180  $\mu$ l ředícího roztoku + 20  $\mu$ l standardu o koncentraci 50  $\mu$ g/l je výsledný přídavek v jamce cca. 4,55  $\mu$ g/l.

## **Diluční Linearita**

Vzorky sér jsou postupně ředěny ředícím roztokem a poté analyzovány. Měření se provádí dle návodu k použití příslušné ELISA soupravy při použití minimálně tří vzorků, které jsou měřeny v dubletech. Ze základního ředění se séra dále ředí postupně 2×, 4× a 8×. U vzorků se vyhodnocuje koncentrace naměřená vůči koncentraci očekávané, linearitu vyjadřuje poměr hodnoty naměřené a očekávané, jehož hodnota se musí pohybovat v rozmezí 80-120% vzhledem k očekávané koncentraci.

## **Vliv matrice vzorku**

Sleduje vliv druhu matrice vzorků na stanovení koncentrace sledovaného analytu. Vliv matrice vzorku se testuje ve vzorcích séra a plazmy (citrátová, heparinová a EDTA plazma) připravených z jednoho odběru. Měří se vzorky z odběrů od deseti pacientů. Vzorky se ředí podle návodu k příslušné ELISA soupravě. Srovnává se koncentrace naměřená v plazmových vzorcích s koncentrací zjištěnou v séru. Dále se vypočítají průměrné koncentrace analytu v jednotlivých typech vzorků (sérum, citrátová, heparinová a EDTA plazma) a procenta analytu naměřeného v plazmových vzorcích vztažená na koncentraci v séru (hodnota se musí pohybovat v rozmezí 80-120%). Eventuálně se určí korelace mezi sérem a jednotlivými typy plazmy. Pokud je koeficient determinace u některého z typů plazmy  $R^2 < 0,8$ , není tento materiál vhodný k použití pro stanovení daného analytu.

## **Vliv počtu zamražení/ rozmražení vzorku na stanovovanou koncentraci analytu**

Testují se vzorky séra, EDTA plazmy, heparinové plazmy a citrátové plazmy připravené z odběrů od třech různých pacientů, a které jsou postupně opakovaně 1×, 3× a 5× rozmrazeny a znovu zamrazeny. Vzorky se ředí podle návodu k příslušné ELISA.

Opakované rozmražení a zamražení se provádí tak, že se zamražené vzorky určené pro rozmražení na 30 min nechají temperovat při laboratorní teplotě (objem alikvotovaného vzorku 100  $\mu$ l a poté se opět zamrazí. Poté se všechny vzorky zamrazí a uchovávají se při - 80 °C do doby provedení ELISA testu.

Srovnává se koncentrace naměřená u vzorků několikrát přemražených s referenční hodnotou, kterou je koncentrace naměřená u 1× přemraženého vzorku. Analyt je považován za odolný vůči opakovanému rozmražení/zamražení pokud naměřené koncentrace dosahují 80-120% referenční hodnoty.

## **Stabilita vzorků při 2-8 °C**

Sleduje se stabilita stanovovaného analytu ve vzorku uchovávaném při 2-8 °C po dobu jednoho a sedmi dnů. Testují se vzorky séra, EDTA plazmy, citrátové a heparinové plazmy připravené z odběrů od třech různých pacientů. Před testem stability se vzorky nejprve zakonzervují 0,1% azidem sodným a 0,03% kyselinou  $\epsilon$ -aminokapronovou. Alikvoty jednotlivých vzorků se rozdělí do tří skupin. První skupina (referenční) se ihned zamrazí na - 80 °C. Druhá skupina je uchovávána při 2-8 °C po dobu 24 h a poté je zamrazena na - 80 °C. Třetí skupina je uchovávána při 2-8 °C po dobu 7 dnů a poté opět zamrazena na - 80 °C. Vzorky jsou uchovávány zamražené při - 80 °C až do doby provedení ELISA testu. Srovnává se koncentrace naměřená u vzorků uchovávaných při 2-8 °C s koncentrací vzorků uchovávaných při - 80 °C. Vzorky je možné uchovávat při 2-8 °C po dobu jednoho resp. sedmi dnů, pokud naměřené koncentrace dosahují 80 –120% referenční hodnoty (tj. vzorku ihned zamraženého a uchovávaného při - 80 °C.

## **Srovnání s jinou metodou**

V případě, že existuje jiný dostupný komerční ELISA kit na stanovení analytu, provede se srovnání na skupině vzorků a zjistí se korelace mezi srovnávanými ELISA metodami. Pokud jsou dostupné, je třeba do souboru testovaných vzorků zařadit i vzorky s vyššími naměřenými koncentracemi stanovovaného analytu.

## **1.2.4 Optimalizace podmínek ELISA**

Optimalizací podmínek ELISA se rozumí optimalizace doby a teploty jednotlivých inkubací, počet promývacích kroků, podmínek vazby protilátky nebo antigenu na mikrotitrační desku, jako i optimalizace koncentrací jednotlivých složek ELISA (vazebných a detekčních protilátek, standardu a vhodného ředění vzorků v testu) tak, aby test ELISA splňoval požadavky na analytickou charakteristiku ELISA soupravy. Při optimalizaci diagnostických souprav jsme vycházeli z údajů v odborné literatuře (Mančal: 1987; Wild D et al: 2013) z vnitřní standardní normy komerční firmy, která vyrábí diagnostické soupravy pro vědu a výzkum ([www.biovendor.com](http://www.biovendor.com)).

### **1.2.4.1 Sestavení ELISA**

#### **Výběr mikrotitrační desky**

Mikrotitrační desky na vazbu protilátky se používají polystyrénové 96 jamkové s vyjímatelnými stripy a s různou afinitou vazby. Nejčastěji jsou používány



mikrotitrační desky s vysokou afinitou firmy COSTAR-High Binding a NUNC-Maxisorp nebo desky se střední afinitou firmy NUNC-Polysorp.

### **Roztok pro vazbu na povrch mikrotitrační desky**

Jako vazebný roztok se používá zejména hydrogenuhlíčitánový roztok o pH 9 nebo uhličitánový/hydrogenuhlíčitánový roztok o pH 9,6.

### **Výběr protilátky pro vazbu analytu**

Protilátka pro vazbu vyšetřovaného analytu může být specifická polyklonální nebo monoklonální. Kvalita a čistota protilátky je důležitým faktorem pro úspěšné sestavení celé ELISA. Podmínky pro skladování a manipulaci s protilátkou jsou uvedeny v produktovém listu od výrobce. Koncentrace protilátky na desce se při prvním pokusu volí kolem 2 ng/l a v průběhu optimalizace ELISA je možné ji dle potřeby měnit v rozmezí 0,5 ng/l, 1 ng/l, 3 ng/l, atd. U monoklonálních protilátek se doporučuje začít s koncentrací 1 ng/l. Při volbě koncentrace protilátky používané pro vazbu na mikrotitrační desku je potřeba brát v úvahu očekávanou koncentraci stanovovaného analytu, kdy např. při očekávané vysoké koncentraci analytu musíme volit vyšší koncentraci na mikrotitrační desku navázané protilátky.

### **Vazba protilátky na mikrodesku**

Při vazbě protilátky na mikrotitrační desku se nejprve protilátka naředí na požadovanou koncentraci pomocí vazebného roztoku a směs se důkladně promíchá. Poté se do všech jamek mikrotitrační desky dává 100 µl připraveného roztoku protilátky. Po zakrytí mikrotitrační desky víčkem nebo fólií následuje inkubace při teplotě 2-8 °C přes noc (minimálně po dobu 16 h).

### **Blokování mikrotitrační desky**

Po imobilizaci protilátky na povrch jamek mikrotitrační desky se volná vazebná místa na desce zablokuje, aby se zabránilo nespecifické adsorbci ostatních ELISA reagensů. Blokovací roztok obsahuje kromě základního pufru (TBS nebo PBS) složky, které můžeme rozdělit do třech kategorií: proteinové (BSA, želatina, kasein, odtučněné sušené mléko, ovalbumin), neproteinové (sacharóza) a detergenty (Tween 20, Triton-X-100). Současně s blokováním desky se protilátka na desce stabilizuje pro dlouhodobé uskladnění desky.

### Postup blokování mikrotitrační desky

Po ukončení inkubace s vazebnou protilátkou je z mikrotitrační desky nejprve odsát vazebný roztok s nenavázanou protilátkou a poté je deska  $1 \times$  promyta promývacím roztokem ( $350\text{--}400 \mu\text{l}$ / jamku) a znovu odsáta. V dalším kroku je do jamek mikrotitrační desky dávkováno blokovací činidlo a následuje inkubace 60 min při laboratorní teplotě. Poté je blokovací činidlo odsáto. V případě potřeby delšího uskladnění se deska zataví do hliníkové folie se sušidlem a uskladní při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Ředící roztok

Účinnost vazebných reakcí v ELISA je výrazně závislá od použitého ředícího roztoku. Tato vazba závisí na pH a iontových silách základního pufru (TBS, PBS) a přítomnosti přídavných látek jako jsou detergenty (Tween 20), inhibitory proteáz, antibakteriální konzervanty (thimerosal, azid sodný, kyselina  $\epsilon$ -amino kapronová) a inertní proteiny (hovězí sérový albumin, želatina, imunoglobuliny) a na eliminaci nespecifických interakcí. Pro stanovení optimálních podmínek ELISA musí být testovány různé ředící pufrы pro každou kombinaci protilátek v ELISA.

### Standard

Standard může být nativní nebo rekombinantní protein o známé koncentraci a je nutný pro kvantitativní stanovení množství analytu v testovaných vzorcích. V případě použití polyklonálních protilátek, je nejlépe jako standard volit rekombinantní protein (antigen), který sloužil k imunizaci. Ze standardu se připraví sada standardů s klesající koncentrací standardu, které se použijí k sestrojení kalibrační křivky. Kalibrační křivka se sestrojí vynesáním hodnot absorbance standardů (Y) proti  $\log$  známých koncentracích standardů (X), použitím *4-parametrové* funkce. Jinou možností je použít *logit/log* funkce k linearizaci kalibrační křivky (např.  $\logit$  absorbance (Y) proti  $\log$  známých koncentracích standardů). Protože absorbance standardů jsou úměrné jejich koncentraci, lze z kalibrační křivky odečíst koncentrace analytu v neznámých vzorcích.

Rozsah standardní křivky určuje standard s nejvyšší a nejnižší koncentrací. Jejich hodnoty se volí podle předpokládané koncentrace analytu ve vzorcích. Pokud se koncentrace analytu ve vzorcích pohybuje řádově v  $\mu\text{g/l}$ , rozsah křivky se bude pohybovat řádově v  $\text{ng/l}$ . Koncentrace stanovovaného analytu při určitém ředění by se měly pohybovat ve střední části standardní křivky.

## **Příprava standardu**

Manipulace a uskladnění standardu se řídí podle instrukcí výrobce, které jsou uvedené v produktovém listu. Pracovní roztok standardu se připraví dle předpokládaného nejvyššího bodu kalibrační křivky a to tak, že jeho koncentrace je např. 50× vyšší než je koncentrace nejvyššího standardu. Pro přípravu pracovního roztoku standardu je vhodné použít stabilizační roztoky, např. roztok StabilZyme HRP. Jednotlivé standardy se poté připraví ředěním z pracovního roztoku standardu pomocí ředícího roztoku. Kalibrační křivka by měla mít minimálně pět bodů (tedy použití pěti kalibrátorů v testu), optimálně šest a v případě potřeby, pro zvýšení citlivosti stanovení, i sedm bodů.

## **Vzorky**

V ELISA testu mohou být stanovovány hladiny analytu v různých typech biologických vzorcích (sérum, plazma, moč, likvor, tkáňové kultury atd). Vzorky mohou být měřeny ihned po odběru, nebo mohou být uskladněny při -20 °C, pro dlouhodobé skladování při -80 °C. Stabilita vzorků při 2-8 °C a vliv opakovaného rozmražení/zamražení vzorků je předmětem testování analytických charakteristik ELISA soupravy. Ředící faktor je závislý na koncentraci analytu ve stanovovaném vzorku a potřebné citlivosti metody. Normální hladiny analytu ve vzorcích při určitém ředění by se měly pohybovat ve střední části kalibrační křivky, aby bylo možné změřit i nízké nebo vysoké koncentrace analytu. Ředění vzorků do ELISA testu by nemělo být menší než 3×, aby nedocházelo ke vlivu matrice vzorku na koncentraci analytu. Při nutnosti vysokého ředění vzorků do ELISA testu je vhodnější použít dvoukrokové ředění vzorků, např. při ředění 1000× se vzorek v prvním kroku naředí 50× a v druhém kroku 20×. Minimální množství nativního vzorku použitého k ředění by mělo být do objemu 5 µl. V případě automatického zpracování (biorobot: DSX, DS2) by měl být minimálně 10 µl. Při ředění vzorku lze použít diluční strip (diluční mikrotitrační desku) nebo ředit přímo do testovací mikrotitrační desky (méně vhodné, ale šetří čas nutný k ředění, např. při zpracování 80 vzorků biorobotem se čas, potřebný k naředění vzorků pohybuje okolo 30 min). Do mikrotitrační desky je obvykle dávkováno 100 µl vzorku.

## **Imunizace**

Všechna zvířata jsou imunizována schválenými imunizačními schémata (Ústřední komise pro ochranu zvířat). Pro přípravu polyklonálních protilátek se imunizují dva typy zvířat – ovce a králík. Ovce se celkem odebírají 2× (první odběr cca. 8. týden od začátku imunizace a druhý odběr cca. 18. týden od začátku

imunizace). Výtěžnost z odebraného imunního séra se pohybuje kolem 0,5 mg polyklonální protilátky z 1 ml séra. Pro imunizaci je zapotřebí asi 3 mg antigenu. V případě imunizace králíka jsou intervaly prvních dvou odběrů shodné s imunizačním schématem ovce. Další odběry následují vždy v periodě 60 dnů od posledního odběru. Celkový výtěžek imunizace je podobný jako v případě imunizace ovce.

U nového lotu protilátky je vždy potřeba ověřit optimální koncentraci protilátky pro vazbu na mikrotitrační desku (např. pokud byla původní protilátka navázána v koncentraci 2 ng/l, u nového lotu protilátky se k otestování použije kromě této koncentrace zároveň ještě rozmezí koncentrací 1; 3; 4 ng/l příp. i více). Odchyly mezi loty protilátek mohou být způsobené např. použitím protilátky z jiného odběru nebo k imunizaci byl použit jiný lot antigenu nebo k purifikaci byla použita nová kolona. Výsledky mohou být také ovlivněny chybou vznikající při stanovení koncentrace u více koncentrovaných protilátek v důsledku vysokého ředění vzorků. Pokud mají být protilátky později použity ke konjugaci, nesmí se k nim přidávat konzervanty ani podpůrné látky pro zlepšení stability ( např. BSA, želatina apod.)

### **Detekční protilátka**

Detekční protilátka proti stanovovanému analytu může být stejně jako vazebná protilátka monoklonální nebo specifická polyklonální. Detekční protilátka je ve většine případů značená enzymem přímo (biotin, HRP), ale může být i neznačená. Koncentrát značené detekční protilátky se standardně uchovává při -20 °C. Při optimalizaci ELISA je potřebné otestovat detekční protilátku, která je naředěna na různé koncentrace (od 1; 0,5; 0,2; 0,1 ng/l) v objemu 100 µl/jamka. Při prvních testech je možné se řídit obecným pravidlem, že vazebná protilátka na desce je 10× koncentrovanější jako použitá detekční protilátka. Při výběru nejvhodnější koncentrace se vyhodnocuje absorbance blanku (čistý ředící roztok), jehož absorbance by měla být pod 0,1 (A450 nm) a absorbance nejvyššího bodu standardní křivky menší než 3,0 (A450 nm).

Pokud mají být protilátky později použity ke konjugaci, nesmí se k nim přidávat konzervanty ani podpůrné látky pro zlepšení stability ( např. BSA, želatina apod.) Protílátka, která má být konjugována musí být zejména čistá (bez albuminu, nesmí obsahovat konzervanty) a musí mít potřebnou koncentraci.

## **Konjugát**

Pokud není detekční protilátka přímo značená enzymem HRP, může dojít ke dvěma situacím. V případě, že detekční protilátka je značená biotinem, v dalším kroku ELISA se použije konjugát streptavidin-HRP. Nejčastěji se používá streptavidinový konjugát firmy Roche nebo Amersham a uchovává se dle údajů od výrobce nebo jako koncentrát v glycerolu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V případě, že detekční protilátka není značená biotinem, použije se v dalším kroku ELISA protilátka proti detekční protilátce konjugovaná s enzymem HRP, např. u kozí detekční protilátky se může použít králičí protilátka proti kozí konjugované s HRP. Terciární protilátka by měla být vysycená IgG proti použité vazebné protilátce. Zásobní roztok tohoto konjugátu se standardně uchovává dle údajů od výrobce.

V úvodních testech při sestavování ELISA se doporučuje použít jedno pracovní ředění konjugátu streptavidin-HRP např.  $20\ 000\times$ , které se ovšem může měnit v průběhu optimalizace ELISA. Stabilita pracovního roztoku streptavidin-HRP konjugátu firmy Roche nebo Amersham při  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  naředěného v roztoku StabilZyme HRP je jeden rok.

## **Substrát**

Substrát se přidává v předposledním kroku ELISA testu. Volba typu substrátu závisí na použitém enzymu. V případě enzymu HRP je vhodným substrátem jednosložkový substrát s obsahem peroxidu vodíku (tetrametylbenzidin - TMB), komerčně dostupný pod názvem Seramun (např. firma KPL). Standardně je dávkován do testu ELISA v objemu  $100\ \mu\text{l}$ / jamka.

## **Zastavovací roztok**

Pro zastavení enzymatické reakce se používá zastavovací roztok  $0,2\ \text{M}$  kyseliny sírové a to v objemu  $100\ \mu\text{l}$ / jamka.

Při optimalizaci podmínek ELISA je kritická úspěšná vazba testovaného analytu na imobilizovanou vazebnou protilátku a na detekční protilátku. Pro získání požadovaných výsledků, se tato vazba dá ovlivnit několika faktory při provedení ELISA:

## **Volba podmínek pro test ELISA**

### Doba inkubace

Na dosažení maximálního signálu a minimalizaci chyb je potřeba dostatečného času inkubace pro ustavení vazebné rovnováhy mezi protilátkou

a analytem. Jakékoliv změny v délce doby inkubace mohou ale nemusí mít vliv na intenzitu signálu. Délka inkubace se může lišit od několika minut až po několik hodin. Rychlost reakce protilátka-analyt může být odlišná pro vzorky a pro standard. Doba inkubace standardů a vzorků v mikrotitrační desce je nejčastěji 1 h, alternativně 2 h, v ojedinělých případech i přes noc. Inkubace se provádí ve většině případů při laboratorní teplotě nebo při 37 °C (nutnost vyhřívání inkubátoru), ojediněle při 4 °C. Může nastat nutnost kontinuálního třepání po celou dobu inkubace. Doba inkubace s detekční protilátkou se pohybuje od 30 min po dobu 2 h. Doba inkubace s konjugátem strptavidin-HRP se pohybuje od 30 min po dobu 1 h. Doba inkubace se substrátem je minimálně 5 min, optimálně 10 min. V případě potřeby je možno inkubační dobu prodloužit až na 30 min v závislosti na intenzitě zbarvení reakční směsi.

### Inkubační teplota

Teplota inkubace má vliv na rychlost reakce analyt-protilátka, přičemž platí, že vyšší teplota zpravidla zvyšuje rychlost této reakce. Nejčastěji se využívá inkubace při laboratorní teplotě, cca. 25 °C nebo 37°C, alternativně při 4 °C (za předpokladu delší doby inkubace např. přes noc).

### Separáčn

Protože ELISA patří mezi heterogenní imunoanalýzy je nutná separace nenavázané frakce od vázané. K tomuto účelu se používá promytí mikrodestičky vhodným promývacím roztokem. V ideálním případě se tak děje automaticky při použití promývačky, kde je možnost volby jak objemu dávkovaného roztoku, tak počet promývacích cyklů eventuálně i nastavení pohybu aspiračních jehel promývačky, aby došlo k úplnému odsátí roztoku z jamek mikrotitrační desky před dalším krokem. Při použití více druhů mikrotitračních desek je nutné naprogramovat promývačku na rozměry jamky konkrétní mikrotitrační desky. Pokud je promytí provedeno manuálně pomocí multikanálové pipety, je nutné po posledním promývacím kroku důkladně odstranit zbytky roztoku z jamek razantním vytřepáním mikrotitrační desky do savého papíru. Doba setrvání promývacího roztoku v jamce mikrotitrační desky mezi jednotlivými promývacími kroky by měla být alespoň 20 sekund. Faktory, které přímo ovlivňují reakci mezi analytem a protilátkou, při promytí jsou složení promývacího roztoku, intenzita promývání (rychlost) a způsob promývání (manuální nebo automatické).

### **Standardní postup při analýze vzorků ELISA testem**

1. Navázání mikrotitrační desky vazebnou protilátkou
2. Promytí desky promývacím roztokem  $1\times$
3. Zablokování nespecifických vazebných míst protilátkou
4. Odsátí blokovacího pufru a vysušení desky
5. Příprava sady standardů a naředění vzorků
6. Pipetování standardů, kontrolních sér, ředícího roztoku (=Blank) a naředěných vzorků (v ideálním případě duplikáty) do příslušných jamek na mikrotitrační desce. Doporučený čas pipetování celé desky je maximálně 15 min.
7. Inkubace na orbitální třepače
8. Promytí desky promývacím roztokem  $3\times$  (0,35 ml na každou jamku)
9. Přidání roztoku detekční protilátky do každé jamky desky
10. Inkubace na orbitální třepače
11. Promytí desky promývacím roztokem  $3\times$  (0,35 ml na každou jamku)
12. Přidání roztoku konjugátu do každé jamky desky
13. Inkubace na orbitální třepače 30 min
14. Promytí desky promývacím roztokem (0,35 ml na každou jamku)
15. Přidání roztoku substrátu (inkubace se provádí ve tmě a ve většině případů bez třepání)
16. Inkubace 10 min při laboratorní teplotě (inkubační doba může být prodloužena až na 20 min, pokud je reakční teplota  $< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
17. Přidání zastavovacího roztoku
18. Změření absorbance v každé jamce na fotometru při nastavené vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce na 620 nm (přijatelné rozmezí: 550 – 650 nm). Odečtení absorbance při 630 nm (nebo při jiné zvolené vlnové délce z rozmezí 550 – 650 nm) od absorbancí při 450 nm. (Měření by mělo být provedeno do pěti minut po přidání zastavovacího činidla)

## 2. Cíle disertační práce

Hlavním cílem mé disertační práce byla spolupráce na vývoji ELISA souprav pro specifická stanovení koncentrací vybraných molekul a ověření jejich funkce provedením základní validace.

1. Navržení, sestavení a ověření funkce ELISA testu pro stanovení koncentrace osteokrinu a ověření efektivity tohoto testu při hledání vztahů mezi kostním a energetickým metabolismem.
2. Ověření předpokladu dříve publikovaného na jiném typu populace o eventuální souvislosti mezi koncentrací PEDF v séru a rizikem rozvoje metabolického syndromu u kavkazské populace.
3. Vývoj, validace a klinické testování ELISA soupravy pro specifické stanovení sérové koncentrace lidského VILIP-1 a nalezení souvislosti mezi koncentrací VILIP-1 v séru a ostatními ukazateli poškození mozkových buněk u pacientů s mozkovou mrtvicí.
4. Ověření diagnostické efektivity sekretagoginu u pacientů s kraniotraumatem. Stanovení referenčních hodnot pro sekretagogin u zdravých fyziologických novorozenců.
5. Jelikož v průběhu projektu nebyly cíleně sledovány ani popsány souvislosti mezi Dkk-1 a parametry kostního obratu či kostní densitou v několika lokalitách (vyjádřenou jako T-skóre) bylo dalším cílem mé práce navržení, sestavení a ověření funkce ELISA testu pro rychlé stanovení Dkk-1 a ověření efektivity tohoto testu u pacientů s osteoporózou.
6. Ověření diagnostické efektivity stanovení chemerinu pro diagnostiku metabolického syndromu.
7. Ověření diagnostické efektivity stanovení PSP-94 jako onkomarkeru u osob s karcinomem prostaty.
8. Ověření diagnostické efektivity stanovení TFF u žen s karcinomem endometria
9. Ověření diagnostické efektivity stanovení S100A-11 u žen s karcinomem endometria.



## **3. Metodika**

### **3.1 Spolupráce na vývoji ELISA souprav pro specifická stanovení koncentrací vybraných molekul**

V rámci hledání možností stanovení nových molekul pro laboratorní diagnostiku vybraných onemocnění jsme se zaměřili na vývoj nového ELISA testu, pomocí něhož bychom byli schopni stanovit jejich koncentraci v séru, plazmě nebo likvoru. Při návrhu testu jsme vycházeli z dostupných odborných informací popisujících vlastnosti těchto molekul, znalosti jejich exprese v různých tkáních i hypotézy o jejich možném klinickém využití. Při vývoji a prvotním nastavení testu jsme se inspirovali i odbornými rešeršemi popisujících obecné postupy pro měření cytokinů metodou ELISA.

Příprava rekombinantních proteinů a protilátek použitých v ELISA testech, včetně jejich optimalizace, byla provedena ve výzkumných laboratořích firmy Biovendor laboratorní medicína a.s.

V době vývoje ELISA souprav nebyla na trhu dostupná žádná validovaná ELISA souprava jiného výrobce, proto jsme pro sestavení plánu pro ověření analytických charakteristik jednotlivých ELISA testů vycházeli z doporučení odborných společností (ČSKB), z odborné literatury a využili jsme i dlouhodobé zkušenosti výrobců ELISA souprav. Validační plán byl vytvořen i s ohledem na požadavky pro rozsah ověřování analytických charakteristik ELISA souprav pro výzkumné účely a jejich eventuálnímu budoucímu komerčnímu využití.

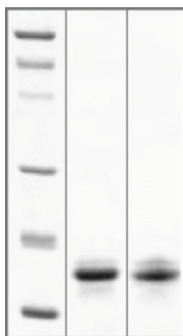
Ověření analytických charakteristik ELISA souprav podle námi sestaveného plánu, které zahrnovalo ověření preciznosti, vychýlení metody, zjištění limitu detekce, meze stanovitelnosti, případné křížové reaktivity, stabilitních testů a vlivu matrice bylo provedeno na Oddělení laboratorní medicíny Středomoravské nemocniční a.s. Provedení měření ELISA testů v rámci klinických studií bylo provedeno na Oddělení laboratorní medicíny Středomoravské nemocniční a.s.

Vzhledem ke skutečnosti, že ELISA soupravy jsou určeny pro komerční využití je v následujících kapitolách uveden pouze zkrácený popis přípravy rekombinantních proteinů a specifických protilátek, včetně jejich optimalizace pro použití v ELISA testu.

### 3.1.1 Osteokrin (1)

#### Příprava rekombinantního lidského osteokrinu

Sekvence mRNA genu osteokrinu byla získána z databáze RefSeq (Accession Number NM\_1981184); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E. coli*. Syntetický gen byl klonován do expresního vektoru pRSET (Invitrogen); následně byla provedena transformace bakteriálního kmene *E. coli* JM109DE3. Produkční kmen byl kultivován při teplotě 37 °C a poté byla provedena indukce exprese rekombinantního proteinu pomocí isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG, Sigma). Po sonikaci produkčních buněk byl z inkluzních tělísek rozpuštěných v 6 M guanidinu, 0,1 M Tris (pH 8,6) izolován metalafinitní (NiNTA) chromatografií rekombinantní osteokrin. Protein byl následně dialyzován do prostředí 50 mM acetátového pufru (pH 4,0), čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (12% homogenní gel, SDS PAGE, obr. 1) a koncentrace bílkoviny stanovena metodou s kyselinou bicinchinovou (BCA metoda, Sigma, katalogové číslo BCA1-1KT).



**Obr.1.** Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou (12% homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o relativních molekulových velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa; v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský Osteokrin (redukovaný a zahřátý vzorek a neredukovaný a nezahřátý vzorek, koncentrace 5 $\mu$ g/dráhu)

## **Příprava specifických protilátek**

Pro sestavení soupravy byly použity 2 různé myší monoklonální protilátky připravené hybridomovou fúzí myších myelomových a B-buněk, které byly získány imunizací králíka rekombinantním myším osteokrinem (rmOsteokrin; AMK 28–130; Accesion No. AAQ84523). IgG frakce byla izolována ze supernatantu afinitní chromatografií s proteinem G. Detekční protilátka byla značena modifikovaným biotinem (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce, katalogové číslo 21338) podle návodu od výrobce. Purifikace protilátky byla provedena pomocí afinitní chromatografie s imobilizovaným lidským rekombinantním osteokrinem. Koncentrace protilátky byla stanovena metodou s kyselinou bicinechinovou, s použitím BSA jako standardu. V tomto systému jsou použity jako vazebná i detekční protilátka myší monoklonální protilátka, která je v obou případech specifická k jiné části molekuly osteokrinu.

## **Provedení ELISA testu pro stanovení Osteokrinu**

Byl sestaven sendvičový test ELISA pro měření osteokrinu v séru. Tento test je vysoce specifický a citlivý díky použití detekční protilátky značené biotinem.

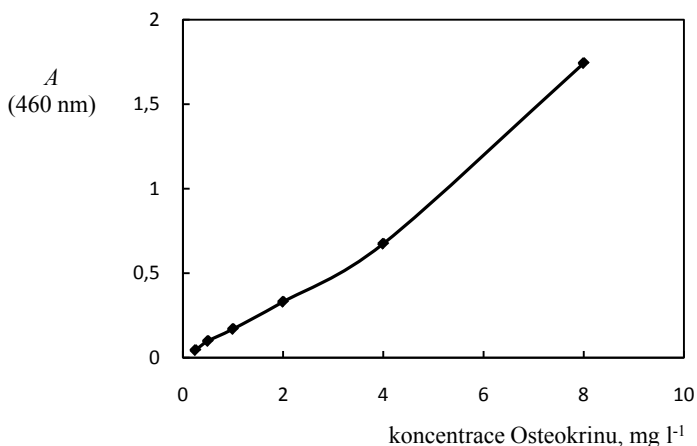
Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v 0,1 M hydrogenuhličitanovém pufru (pH 9,0) s výslednou koncentrací 2 mg l<sup>-1</sup> a do každé jamky mikrotitrační desky (Corning Costar, katalogové číslo 21338) bylo dávkováno 0,1 ml protilátky. Následovala inkubace 16 h při 4 °C a po odsátí vazebného roztoku byla destička 1x promyta pomocí TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20). Nеспецифická vazebná místa byla zablokována roztokem TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20), 1,5% BSA a 4% sacharózy do každé jamky bylo dávkováno 0,3 ml roztoku a deska byla inkubována 30 min při laboratorní teplotě. Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 4× zředěného vzorku séra (všechny vzorky i standardy byly měřeny v dubletu). Po inkubaci 1 h při laboratorní teplotě byla deska 3× promyta promývacím roztokem TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) bylo do všech jamek dávkováno 0,1 ml biotinem značené protilátky a deska inkubována 1 h při 25 °C. Poté byla deska opět 3× promyta promývacím roztokem a do každé jamky bylo dávkováno 0,1 ml 7000× zředěného konjugátu streptavidin-křenová peroxidáza (Amdex, katalogové číslo RPN 4401V) a inkubováno 1 h při 25 °C. Po trojnásobném promytí promývacím roztokem bylo do všech jamek dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována 10 min při 25 °C. Reakce byla zastavena přidáním 0,2 M roztoku kyseliny sírové a vzniklé

žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 460 nm. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku.

Koncentrace osteokrinu v neznámých vzorcích byla odečtena z kalibrační křivky (obr. 2, tab. 1), která byla získána vynesemím absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci.

Standardy a vzorky byly ředěny pomocí roztoku TBS-Tw s přidavkem želatiny (0,05%). Stabilizačním roztokem pro biotinylovanou protilátku a konjugát streptavidin-křenová peroxidáza byl komerční roztok Stabilzyme (Surmodic).

V testu byla použita řada standardů 8, 4, 2, 1, 0,5 a 0,25 mg l<sup>-1</sup>, která vznikla naředěním rekombinantního lidského osteokrinu. Sérové vzorky byly ředěny 4× (1 díl vzorku + 3 díly ředícího roztoku).



**Obr. 2.** Standardní křivka pro Osteokrin ELISA; *A* – Absorbance

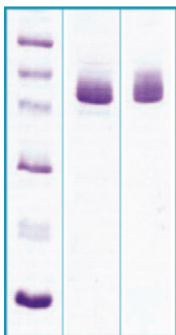
**Tabulka 1** Osteokrin – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v mg l <sup>-1</sup>	Absorbance při 460 nm
8,0	1,743
4,0	0,675
2,0	0,331
1,0	0,17
0,5	0,099
0,25	0,045

### 3.1.2 PEDF

#### Příprava rekombinantního lidského PEDF

Jako standard byl použit rekombinantní lidský PEDF, produkovaný v *E. coli* ( $M_r$  46,1 kDa, obsahující 413 AMK zbytků lidského PEDF a 14 AMK zbytků - His Tag, Biovendor laboratorní medicína a.s.). Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, obr. 3). Koncentrace rekombinantního PEDF byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchinovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).



**Obr.3** .Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou(12% homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o relativních molekulových velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa; v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský PEDF(redukovaný a zahřátý vzorek a neredukovaný a nezahřátý vzorek, koncentrace 5 $\mu$ g/dráhu)

#### Příprava specifických protilátek

Pro sestavení soupravy byly použity dvě různé ovčí polyklonální protilátky, které byly získány imunizací ovce rekombinantním lidským PEDF. IgG frakce byla izolována ze supernatantu afinitní chromatografií s proteinem G. Detekční protilátka byla značena modifikovaným biotinem (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce, katalogové číslo 21338) podle návodu od výrobce. Purifikace protilátky byla provedena pomocí afinitní chromatografie s imobilizovaným lidským rekombinantním PEDF. Koncentrace protilátky byla stanovena metodou s kyselinou bicinchinovou, s použitím BSA jako standardu.

## Provedení ELISA testu pro stanovení PEDF

Byl sestaven sendvičový test pro kvantitativní stanovení lidského PEDF v séru a plazmě.

Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána specifická polyklonální ovčí protilátka proti lidskému PEDF (specShAHUAHuPEDF Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.).

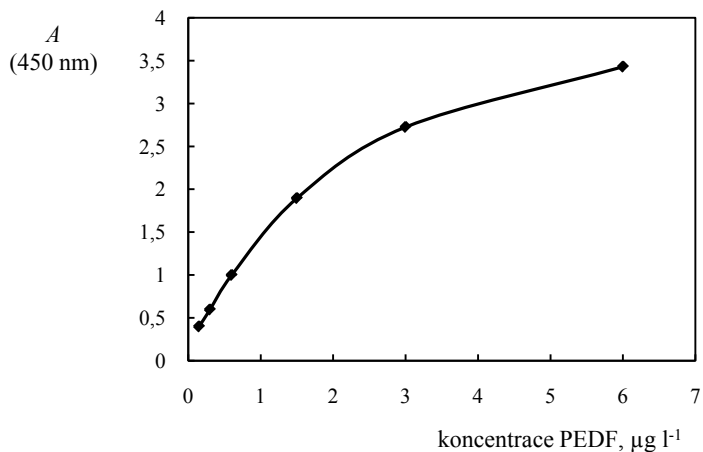
Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v ředícím roztoku (0,1 M hydrogenuhličitanový pufr, pH 9,4) s výslednou koncentrací 2,5 mg l<sup>-1</sup> a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při 4 °C a poté byla deska 1× promyta pomocí roztoku TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa blokována roztokem TBS, 4% sacharózy a 0,5% BSA (dávkováno 0,2 ml/jamku; inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 8000× ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy byly ředěny roztokem 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v TBS a vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1,4% kaseinu, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3).

Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300 rpm. Po promytí desky 5× promývacím roztokem (0,35 ml) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené specifické ovčí polyklonální protilátky IgG (specShAHUAHuPEDF, Biovendor laboratorní medicína a.s.) a deska opět inkubována 1 h při 25 °C. Značení specifické koží polyklonální protilátky IgG biotinem bylo provedeno soupravou od firmy Pierce (detekční protilátka, specShAHUAHuPEDF Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky 0,1 mg l<sup>-1</sup>).

Po dalším promytí desky 5× promývacím roztokem TBS-Tw, bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidáza a deska inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300 rpm (konjugát streptavidin-křenová peroxidáza byl vyroben firmou ROCHE, do testu použit ředěný 90 000× pomocí roztoku 1% BSA v TBS (pH 7,2)). Po promytí desky 5× bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 5 min při 25 °C (TMB, (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla zastavena přidávkem 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku.

Koncentrace PEDF v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr.4, tab. 2), která byla získána vynesemím absorbance standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 6, 3, 1,5, 0,6, 0,3 a 0,15  $\mu\text{g l}^{-1}$  připravená naředěním rekombinantního lidského PEDF.



**Obr.4.** Standardní křivka pro PEDF ELISA; A – Absorbance

**Tabulka 2**

PEDF – závislost hodnoty absorbance standardů na jejich koncentraci

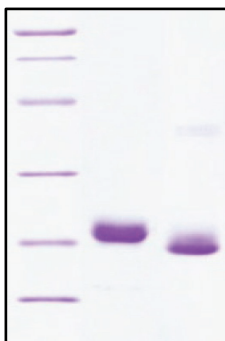
Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
6,0	3,43
3,0	2,726
1,5	1,896
0,6	0,999
0,3	0,596
0,15	0,399

### 3.1.3 VILIP-1(3)

#### Příprava rekombinantního lidského VILIP-1

Sekvence mRNA genu VILIP-1 byla získána z databáze RefSeq (Accession Number NM\_001442); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E. coli*. Syntetický gen byl klonován do restričních míst expresního vektoru pRSET (Invitrogen) s následnou transformací bakteriálního kmene *E. coli* BL21DE3. Produkční kmen byl kultivován při teplotě 37 °C a exprese rekombinantního proteinu byla indukována Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosidem (IPTG, Sigma). Po sonikaci produkčních buněk byl ze supernatantu izolován gelovou chromatografií rekombinantní VILIP-1.

Protein byl dialyzován do prostředí 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,2), čistota proteinu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (12% homogenní gel, SDS PAGE; obr. 5) a koncentrace bílkoviny stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchinovou (BCA metoda, Sigma, katalogové číslo BCA1-1KT).



**Obr.5.** Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou (12% homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o relativních molekulových velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa; v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský VILIP-1 (redukovaný a zahřátý vzorek a neredukovaný a nezahřátý vzorek, koncentrace 5 $\mu$ g/dráhu)



## **Příprava specifických protilátek**

Pro sestavení soupravy byly použity dvě různé králičí polyklonální protilátky, které byly získány imunizací ovce rekombinantním lidským VILIP-1. IgG frakce byla izolována ze supernatantu afinitní chromatografií s proteinem G. Detekční protilátka byla značena modifikovaným biotinem (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce, katalogové číslo 21338) podle návodu od výrobce. Purifikace protilátky byla provedena pomocí afinitní chromatografie s imobilizovaným lidským rekombinantním VILIP-1. Koncentrace protilátky byla stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou, s použitím BSA jako standardu (data nejsou uvedena).

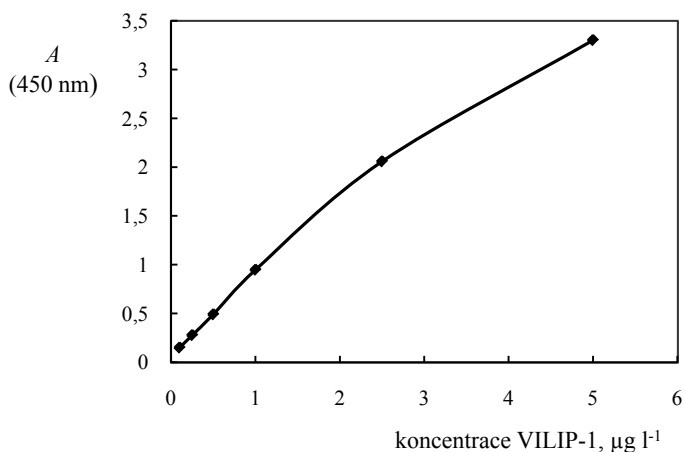
## **Provedení ELISA testu pro stanovení VILIP-1**

Hodnoty sérové ani tkáňové koncentrace VILIP-1 nebyly známy, proto jsme se zaměřili na vývoj sendvičového ELISA testu, který představuje při použití biotinem značené detekční protilátky vysoce citlivou a specifickou metodu. K ELISA stanovení byly použity specifické polyklonální králičí protilátky proti lidskému VILIPu-I (specRAHUAHuVILIP-1, Biovender laboratorní medicína a.s.).

V mikrotitrační desce (NUNC, Maxisorp) bylo vázáno 0,1 ng protilátky/jamku v 0,1 M hydrogenuhličitanového pufru pH 9,0 (výsledná koncentrace protilátky 2 mg l<sup>-1</sup>). Následovala inkubace 12 h při 4°C a po odsátí vazebného roztoku bylo do desky dávkováno 0,2 ml/jamku roztoku 0,5% BSA, 4% sacharózy v TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2) a deska inkubována 30 min při 25 °C pro zablokování nevyužitých vazebných míst na povrchu jamky. Po odsátí blokovacího roztoku (promývačka Columbus, Tecan) bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 3× ředěného sérového vzorku. Vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1,4% kaseinu, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3) a všechna měření byla realizována 2×. Následně byla deska inkubována 1 h při 25°C. Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené králičí polyklonální protilátky IgG (specRAHUAHuVILIP-1, 0,2 mg l<sup>-1</sup>, ředící roztok 1% BSA v TBS (pH 7,2), Biovender laboratorní medicína a.s.) a deska opět inkubována 1 h při 25 °C. Po 5násobném promytí desky roztokem TBS-Tw bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidáza (Roche, ředěný 10 000× v roztoku 1% BSA v TBS, pH 7,2) a deska inkubována 1 h při 25°C. Po promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB (1,2 mM tetrametylbenzidín s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL, katalogové číslo 52-00-01) a reakční směs inkubována

10 min při 25°C. Reakce byla zastavena přidáním 0,1 M roztoku kyseliny sírové (0,1ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení (produkt) bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm. Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku (ELISA reader Biotek EL808).

Hodnoty VILIP-1 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 6), která byla získána vynesemím absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci.



**Obr.6.** Standardní křivka pro VILIP-1 ELISA;  $A$  – Absorbance

V testu byla použita sada standardů 5, 2,5, 1, 0,50, 0,25 a 0,1  $\mu\text{g l}^{-1}$  v pufru s kaseinem připravená ředěním rekombinantního lidského VILIP-1 (tab. 3). Sérové vzorky byly ředěny 10 $\times$  podle schématu 1 díl vzorku + 9 dílů ředícího roztoku.

### Tabulka 3

VILIP-1 – závislost hodnoty absorpance standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
5,0	3,301
2,5	2,058
1,0	0,947
0,5	0,49
0,25	0,277
0,1	0,149

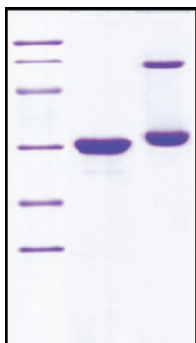
### 3.1.4 SCGN(11)

#### Příprava rekombinantního lidského SCGN

Sekvence mRNA genu SCGN byla získána z databáze UniProt (UniProtKB/Swiss-Prot O76038); příslušná sekvence byla syntetizována a optimalizována pro *E. coli*. Syntetický gen byl klonován do restričních míst expresního vektoru pRSET (Invitrogen) s následnou transformací bakteriálního kmene *E. coli* BL21DE3. Produkční kmen byl kultivován při teplotě 37 °C a exprese rekombinantního proteinu byla indukována Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosidem (IPTG, Sigma). Po sonikaci produkčních buněk byl ze supernatantu izolován gelovou chromatografií rekombinantní SCGN.

K ELISA stanovení byl jako standard použit rekombinantní sekretagoin, produkováný v *E. coli* ( $M_r$  33,3 kDa, obsahující 286 AMK zbytků sekretagoinu) a specifické polyklonální ovčí protilátky proti lidskému SCGN.

Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (12% homogenní gel, SDS PAGE, obr. 7) a koncentrace bílkoviny stanovena metodou s kyselinou bichinoninovou (BCA metoda, Sigma, katalogové číslo BCA1-1KT).



**Obr. 7.** Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou (12 % homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o relativních molekulových velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa; v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský SCGN (redukovaný a zahřátý vzorek a neredukovaný a nezahřátý vzorek, koncentrace 5  $\mu\text{g}/\text{dráhu}$ )

### **Příprava specifických protilátek**

Pro sestavení soupravy byly použity dvě různé ovčí polyklonální protilátky, které byly získány imunizací ovce rekombinantním lidským SCGN. IgG frakce byla izolována ze supernatantu afinitní chromatografií s proteinem G. Detekční protilátka byla značena modifikovaným biotinem (Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce, katalogové číslo 21338) podle návodu od výrobce. Purifikace protilátky byla provedena pomocí afinitní chromatografie s imobilizovaným lidským rekombinantním SCGN. Koncentrace protilátky byla stanovena metodou s kyselinou bicinchoninovou, s použitím BSA jako standardu (data nejsou uvedena).

### **Provedení ELISA testu pro stanovení SCGN**

Byl navržen a sestaven šestičlenný ELISA test pro kvantitativní stanovení lidského sekretoginu v séru a plazmě.

Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána specifická polyklonální ovčí protilátka proti lidskému SCGN (specShAHUAHuSekretogin Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.).

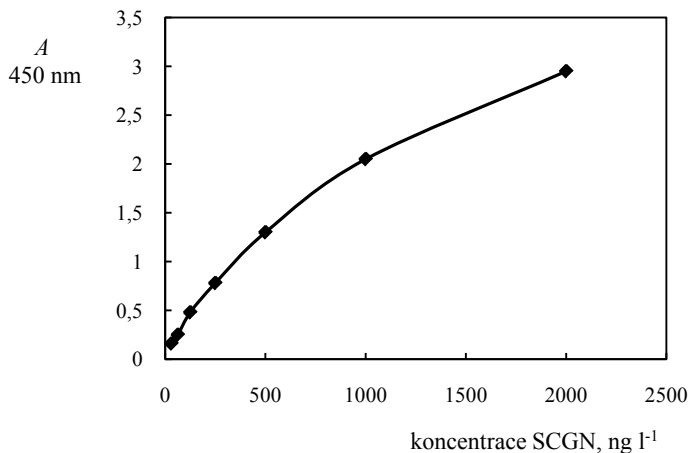
Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v ředícím roztoku (0,1M hydrogenuhličitanový pufr, pH 9,4) s výslednou koncentrací 2,0  $\text{mg l}^{-1}$  a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při 4 °C a poté byla deska 1× promyta pomocí

roztoku TBS-Tw (0,05M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa byla blokována roztokem 4% sacharózy a 0,5% BSA v TBS (dávkováno 0,25ml/jamku; inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 3× ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy byly ředěny roztokem 1% BSA v TBS (pH 7,2) s přídatkem 0,01 % Thimerosalu. Vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v TBS.

Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300rpm. Po 3násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw (0,35 ml) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené specifické ovcí polyklonální protilátky IgG (specShAHUAHuSekretagogin, Biovender laboratorní medicína a.s.) a deska opět inkubována 1 h při 25 °C. Značení specifické kozí polyklonální protilátky IgG biotinem bylo provedeno soupravou od firmy Pierce (detekční protilátka, specShAHUAHuSekretagogin Antibody, Biovender laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky 0,2 mg l<sup>-1</sup>).

Po opětovném 3násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw, bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidáza a deska inkubována 30 min při 25°C za třepání 300rpm (konjugát streptavidin-křenová peroxidáza byl vyroben firmou ROCHE, do testu použit ředěný 10 000× pomocí roztoku 1% BSA v TBS (pH 7,2)). Po promytí desky TBS-Tw bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 10 min při 25 °C (TMB, (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla zastavena přídatkem 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace Sekretagoginu v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 8), která byla získána vnesením absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 2000, 1000, 500, 250, 125 a 62,5 ng l<sup>-1</sup> v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského Sekretagoginu (tab. 4).



**Obr. 8.** Standardní křivka pro SCGN ELISA; A – Absorbance

**Tabulka 4**

SCGN – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v ng l <sup>-1</sup>	Absorbance při 450 nm
2000	2,95
1000	2,05
500	1,3
250	0,78
125	0,48
63	0,25
31,25	0,16

### 3.1.5 Dkk-1(5)

#### Příprava rekombinantního lidského Dkk-1

Jako standard byl použit komerční rekombinantní Dkk-1 lidský protein o relativní molekulové hmotnosti 25,8kDa, který byl exprimován v buňkách hmyzu *Spodoptera frugiperda* (Sf 21).

Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, data nejsou uvedena).

Koncentrace rekombinantního Dkk-1 byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich). V testu linearity byl jako ředící roztok použit roztok TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2) s přísadkou 0,01% Thimerosalu.

### **Provedení ELISA testu pro stanovení Dkk-1**

Byl navržen a sestaven dvířkový ELISA test pro kvantitativní stanovení lidského Dkk-1 v séru. K ELISA stanovení byly použity specifické polyklonální koží protilátky proti lidskému Dkk-1.

Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána specifická polyklonální koží protilátka proti lidskému Dkk-1 (specGoAHUAHuDkk-1 Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.).

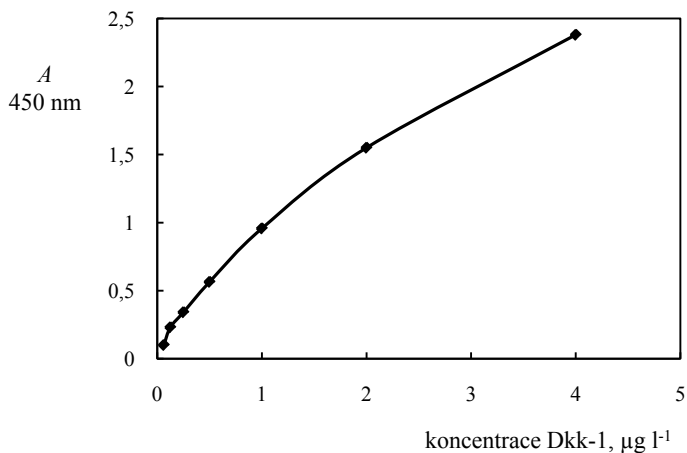
Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v ředícím roztoku (0,1M hydrogenuhličitanový pufr, pH 9,4) s výslednou koncentrací 1 mg l<sup>-1</sup> a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při 4°C a poté byla deska 1× promyta pomocí roztoku TBS-Tw (0,05M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa blokována roztokem 4% sacharózy a 0,5% BSA v TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; dávkováno 0,2 ml/jamku; inkubace 30 min při 25°C). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 3× ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy a vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1% BSA, s přísadkou heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies, pH 7,2) v 0,15M PBS (0,12M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3).

Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C. Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené koží polyklonální protilátky IgG a deska opět inkubována 1 hpři 25 °C. Značení specifické koží polyklonální protilátky IgG biotinem bylo provedeno soupravou od firmy Pierce (detekční protilátka, specGoAHUAHuDkk-1 Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky 0,2 mg l<sup>-1</sup>).

Po opětovném 5násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw, bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidáza a deska inkubována 1 h při 25°C (konjugát streptavidin-křenová peroxidáza byl vyroben firmou Roche, do testu použit ředěný 30 000× pomocí roztoku 1% BSA v TBS. Po promytí desky (TBS-Tw) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 10min při 25°C (TMB, (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla

zastavena přidavkem 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace Dkk-1 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 9), která byla získána vynesením absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 4,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,25 a 0,125  $\mu\text{g l}^{-1}$  v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského Dkk-1 (tab. 5).



**Obr. 9.** Standardní křivka pro Dkk-1 ELISA;  $A$  – Absorbance

**Tabulka 5**

Dkk-1 – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
4,0	2,38
2,0	1,55
1,0	0,957
0,5	0,564
0,25	0,341
0,125	0,23
0,063	0,1



### 3.1.6 Chemerin

#### Příprava rekombinantního lidského Chemerinu

Jako standard byl použit rekombinantní lidský chemerin (Glu 21 -Ser 157), produkovaný v *E. coli* ( $M_r$  16kDa, obsahující 137AMK zbytků lidského chemerinu a methionyl 138).

Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, data nejsou uvedena).

Koncentrace rekombinantního chemerinu byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).

#### Provedení ELISA testu pro stanovení chemerinu

Byl navržen a sestaven sendvičový ELISA pro kvantitativní stanovení lidského chemerinu v séru.

Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána specifická polyklonální koží protilátka proti lidskému chemerinu (specGoAHUAHuChemerin Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.).

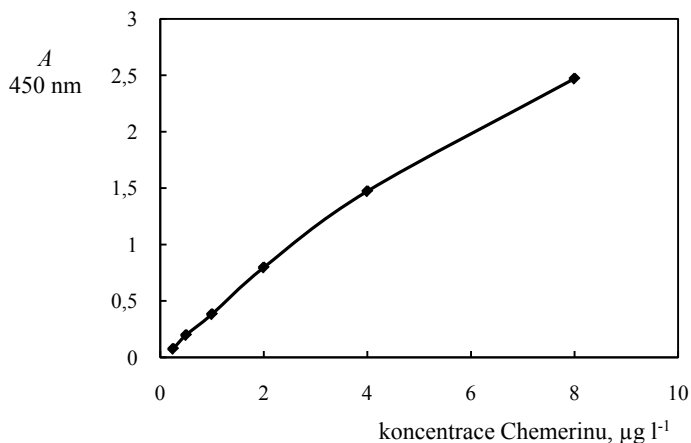
Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v ředícím roztoku (0,1M hydrogenuhličitanový pufr, pH 9,4) s výslednou koncentrací protilátky  $2,5 \text{ mg l}^{-1}$  a do každé jamky desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a poté byla deska  $1\times$ promyta pomocí roztoku TBS-Tw (0,05M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa byla blokována roztokem 4% sacharózy a 0,5% BSA v TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; dávkováno 0,2 ml/jamku; inkubace 30 min při  $25^\circ\text{C}$ ). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo  $100\times$  ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy byly ředěny roztokem 0,05% želatiny, 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie myší IgG,  $1 \text{ g l}^{-1}$ , Scantibodies) v TBS-Tw(pH 7,2) a vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1,4% kaseinu, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG,  $1 \text{ g l}^{-1}$ , Scantibodies) v 0,15M PBS (0,12M NaCl, 0,03M fosforečnan sodný, pH 7,3).

Následně byla deska inkubována 1 h při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  za třepání 300rpm. Po 3násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené koží polyklonální protilátky IgG (specGoAHUAHuChemerin, Biovendor laboratorní medicína a.s., pracovní roztok připraven ředěním koncentrátu  $40\times$  v roztoku 1,4% kaseinu, 0,15 M NaCl, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG,  $1 \text{ g l}^{-1}$ , Scantibodies, pH 7,3) a deska opět inkubována 1 h při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Značení specifické koží polyklonální protilátky IgG biotinem bylo provedeno soupravou od firmy Pierce (detekční protilátka,

specGoAHUAHuChemerin Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Po opětovném 3násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw, bylo do všech jamek desky dávkováno  $0,1 \text{ ml}$  konjugátu streptavidin-křenová peroxidáza a deska inkubována  $1 \text{ h}$  při  $25^\circ\text{C}$  za třepání  $300\text{rpm}$  (konjugát streptavidin-křenová peroxidáza byl vyroben firmou GE Healthcare, Life Sciences, USA, do testu použit ředěný  $60\,000\times$  pomocí roztoku  $1\%$  BSA v TBS. Po promytí desky (TBS-Tw) bylo do všech jamek desky dávkováno  $0,1 \text{ ml}$  substrátu TMB a reakční směs inkubována  $15\text{min}$  při  $25^\circ\text{C}$  (TMB:  $1,2 \text{ mM}$  tetramethylbenzidin s obsahem  $3 \text{ mM}$  peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla zastavena přidávkem  $0,2 \text{ M}$  roztoku kyseliny sírové ( $0,1 \text{ ml/jamka}$ ) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce  $450 \text{ nm}$  (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace chemerinu v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 10), která byla získána vynesemím absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů  $8, 4, 2, 1, 0,5$  a  $0,25 \mu\text{g l}^{-1}$  v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského chemerinu (tab. 6).



**Obr. 10.** Standardní křivka pro Chemerin ELISA;  $A$  – Absorbance

## Tabulka 6

Chemerin – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
8,0	2,471
4,0	1,473
2,0	0,797
1,0	0,383
0,5	0,198
0,25	0,076

### 3.1.7 PSP-94

#### Příprava rekombinantního lidského PSP94

Jako standard byl použit rekombinantní lidský PSP-94 produkovaný v *E. coli* ( $M_r$  12,01kDa, obsahující 94AMK zbytků lidského PSP-94 a 10 AMK zbytků - His Tag).

Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, data nejsou uvedena).

Koncentrace rekombinantního PSP-94 byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).

#### Provedení ELISA testu pro stanovení PSP-94

Byl navržen a sestavensendvičový ELISA test pro kvantitativní stanovení lidského PSP94 v séru a plazmě.

Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána specifická polyklonální ovčí protilátka proti lidskému PSP-94 (specShAHUAHuPSP94 Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.).

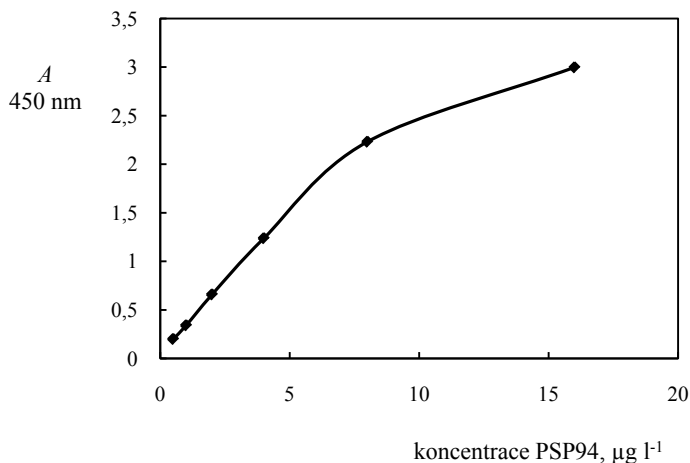
Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v ředícím roztoku (0,1M hydrogenuhličitanový puf, pH 9,4) s výslednou koncentrací  $2,5 \text{ mg l}^{-1}$  a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při  $4^\circ\text{C}$  a poté byla deska  $1\times$  promyta pomocí roztoku TBS-Tw (0,05M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa byla blokována roztokem 4% sacharózy a 0,5% BSA v TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; dávkováno 0,2 ml/jamku; inkubace 30 min při  $25^\circ\text{C}$ ). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo  $5\times$  ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy byly ředěny

roztokem 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG,  $1 \text{ g l}^{-1}$ , Scantibodies) v TBS-Tw (pH 7,2) a vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1,4% kaseinu, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG,  $1 \text{ g l}^{-1}$ , Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3).

Následně byla deska inkubována 1 h při  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  za třepání 300rpm. Po 3násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw (0,35 ml) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml biotinem značené specifické ovčí polyklonální protilátky IgG (specShAHUAHuPSP94, Biovendor laboratorní medicína a.s.) a deska opět inkubována 1 h při  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Značení specifické kozi polyklonální protilátky IgG biotinem bylo provedeno soupravou od firmy Pierce (detekční protilátka, specShAHUAHuPSP94 Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky  $0,3 \text{ mg l}^{-1}$ ).

Po dalším 3násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw, bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml konjugátu streptavidin-křenová peroxidáza a deska inkubována 30 min při  $25^{\circ}\text{C}$  za třepání 300rpm (konjugát streptavidin-křenová peroxidáza, Amersham, do testu použit ředěný  $60\ 000\times$  pomocí roztoku 1% BSA v TBS (pH 7,2)). Po promytí desky (TBS-Tw) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 10 min při  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (TMB: 1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla zastavena přidávkem 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace PSP-94 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 11), která byla získána vynesením absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 16, 8, 4, 2, 1 a  $0,5 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského PSP-94 (tab. 7).



**Obr. 11.** Standardní křivka pro PSP-94 ELISA;  $A$  – Absorbance

**Tabulka 7**

PSP-94 – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
16	2,997
8	2,231
4	1,237
2	0,658
1	0,34
0,5	0,199

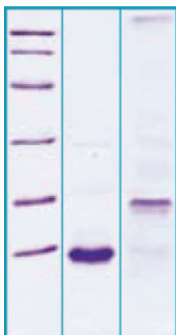
## 3.1.8 TFF

### 3.1.8.1 TFF-1

#### Příprava rekombinantního lidského TFF-1

Jako standard byl použit rekombinantní lidský TFF-1, produkovaný v *E. coli* ( $M_r$  7,9 kDa, obsahující 70AMK zbytků lidského TFF-1 a 10 AMK zbytků - His Tag). Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, obr. 12).

Koncentrace rekombinantního TFF-1 byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchinovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).



**Obr.12 .** Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou (12 % homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o relativních molekulových velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa; v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský TFF-1 (redukováný a zahřátý vzorek a neredukovaný a nezahřátý vzorek, koncentrace 5  $\mu\text{g}/\text{dráhu}$ )

### **Příprava specifických protilátek**

Pro sestavení soupravy byly použity dvě různé králičí polyklonální protilátky, které byly získány imunizací králíka rekombinantním lidským TFF-1. IgG frakce byla izolována ze supernatantu afinitní chromatografií s proteinem G. Purifikace protilátky byla provedena pomocí afinitní chromatografie s imobilizovaným lidským rekombinantním TFF-1. Koncentrace protilátky byla stanovena metodou s kyselinou bicinchinovou, s použitím BSA jako standardu (data nejsou uvedena).

### **Provedení ELISA testu pro stanovení TFF-1**

Byla navržen sestavensendvičový ELISA test pro kvantitativní stanovení TFF-1 v séru a plazmě.

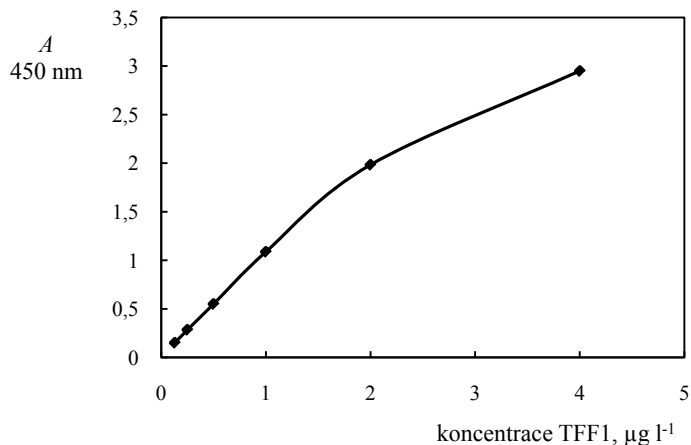
Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána specifická polyklonální králičí protilátka proti lidskému TFF-1 (specRAHUAHuTFF-1 Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.).

Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v ředícím roztoku (0,1M hydrogenuhličitanový pufr, pH 9,4) s výslednou koncentrací 2,0  $\text{mg l}^{-1}$  a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při 4 °C a poté byla deska 1× promyta pomocí roztoku TBS-Tw (0,05M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa byla blokována roztokem 4% sacharózy a 0,5% BSA v TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; dávkováno 0,2 ml/jamku; inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 5× ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy byly ředěny roztokem 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v TBS-Tw (pH 7,2) a vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1,4% kaseinu, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3).

Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300rpm. Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw (0,35 ml) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml roztoku konjugátu. Jako konjugát byla použita specifická králičí polyklonální protilátka IgG s navázanou křenuvou peroxidázou (detekční protilátka specRAHUAHuTFF-1, Biovendor laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky 0,2 mg l<sup>-1</sup>) a deska opět inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300rpm.

Po promytí desky (TBS-Tw) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 10 min při 25 °C (TMB, (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla zastavena přidávkem 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace TFF-1 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 13), která byla získána vynesemím absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 4, 2, 1, 0,5, 0,25 a 0,125 µg l<sup>-1</sup> v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského TFF-1 (tab. 8).



**Obr. 13.** Standardní křivka pro TFF-1 ELISA;  $A$  – Absorbance

**Tabulka 8**

TFF-1 – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
4	2,95
2	1,984
1	1,088
0,5	0,551
0,25	0,285
0,13	0,151

### 3.1.8.2 TFF-2

#### Příprava rekombinantního lidského TFF-2

Jako standard byl použit rekombinantní lidský TFF-2, produkovaný v *E. coli* ( $M_r$  13,2 kDa, obsahující 116AMK zbytků lidského TFF-2 a 10 AMK zbytků - His Tag). Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, data nejsou uvedena).

Koncentrace rekombinantního TFF-2 byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).



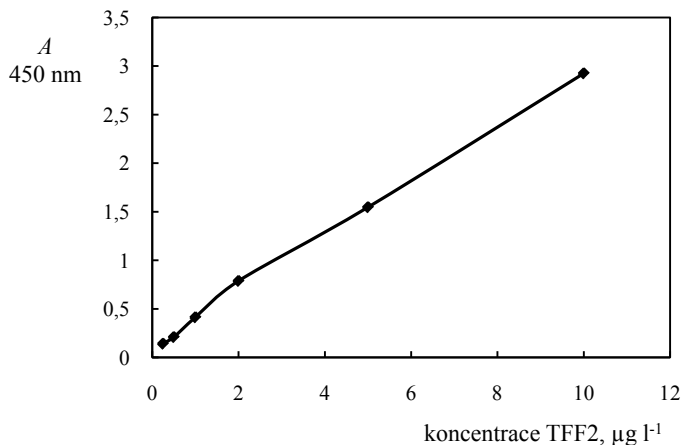
## Provedení ELISA testu pro stanovení TFF-2

Byl navržen a sestaven sendvičový ELISA test pro kvantitativní stanovení TFF-2 v séru a plazmě.

Lyofilizovaná specifická polyklonální králičí protilátka proti lidskému TFF-2 (specRAHUAHuTFF-2 Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.) byla rekonstituována v ředícím roztoku (0,1M hydrogenuhličitanový pufr, pH 9,4) s výslednou koncentrací 2,0 mg l<sup>-1</sup> a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při 4 °C a poté byla deska 1× promyta pomocí roztoku TBS-Tw (0,05M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa byla blokována roztokem 4% sacharózy a 0,5% BSA v TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; dávkováno 0,2 ml/jamku; inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovačního roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 5× ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy byly ředěny roztokem 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v TBS-Tw (pH 7,2) a vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1,4% kaseinu, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3). Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300rpm. Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw (0,35 ml) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml roztoku konjugátu. Jako konjugát byla použita specifická králičí polyklonální protilátka IgG s navázanou křenovou peroxidázou (detekční protilátka specRAHUAHuTFF-2, Biovendor laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky 0,2 mg l<sup>-1</sup>) a deska opět inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300rpm.

Po promytí desky (TBS-Tw) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 10 min při 25 °C (TMB, (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla zastavena přidáním 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace TFF-2 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 14), která byla získána vynesáním absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 10, 5, 2, 1, 0,5 a 0,25 µg l<sup>-1</sup> v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského TFF-2 (tab. 9).



**Obr. 14.** Standardní křivka pro TFF-2 ELISA;  $A$  – Absorbance

**Tabulka 9**

TFF-2 – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
10	2,925
5	1,547
2	0,788
1	0,414
0,5	0,21
0,25	0,142

### 3.1.8.3 TFF-3

#### Příprava rekombinantního lidského TFF-3

Jako standard byl použit rekombinantní lidský TFF-3, produkovaný v *E. coli* ( $M_r$  7,82 kDa, obsahující 59 AMK zbytků lidského TFF-3 a 10 AMK zbytků His - Tag). Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, data nejsou uvedena).

Koncentrace rekombinantního TFF-3 byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).

### Provedení ELISA testu pro stanovení TFF-3

Byl navržen a sestaven sendvičový ELISA test pro kvantitativní stanovení TFF-3 v séru a plazmě.

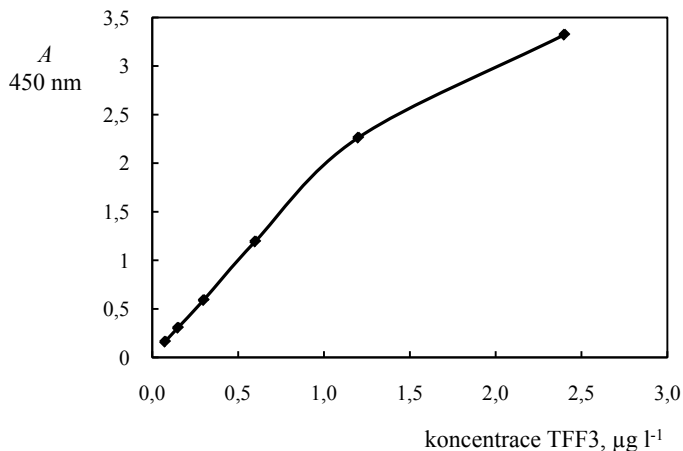
Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána specifická polyklonální králičí protilátka proti lidskému TFF-3 (specRAHUAHuTFF-3 Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.).

Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v ředícím roztoku (0,1M hydrogenuhličitanový pufr, pH 9,4) s výslednou koncentrací 3,0 mg l<sup>-1</sup> a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při 4 °C a poté byla deska 1× promyta pomocí roztoku TBS-Tw (0,05M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa byla blokována roztokem 4% sacharózy a 0,5% BSA v TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; dávkováno 0,2 ml/jamku; inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 5× ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy byly ředěny roztokem 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v TBS-Tw (pH 7,2) a vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1,4% kaseinu, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1 g l<sup>-1</sup>, Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3).

Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300rpm. Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw (0,35 ml) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml roztoku konjugátu. Jako konjugát byla použita specifická králičí polyklonální protilátka IgG s navázanou křenuvou peroxidázou (detekční protilátka specRAHUAHuTFF-3, Biovendor laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky 0,3mg l<sup>-1</sup>) a deska opět inkubována 1 h při 25 °C za třepání 300rpm.

Po promytí desky (TBS-Tw) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 10 min při 25 °C (TMB, (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla zastavena přidávkem 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace TFF-3 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 15), která byla získána vynesemím absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 2,4, 1,2, 0,6, 0,3, 0,15 a 0,075 µg l<sup>-1</sup> v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského TFF-3 (tab. 10).



**Obr. 15.** Standardní křivka pro TFF-3 ELISA;  $A$  – Absorbance

**Tabulka 10**

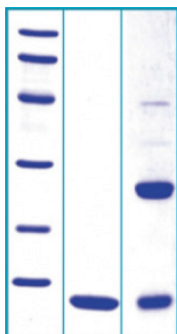
TFF-3 – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
2,4	3,323
1,2	2,263
0,6	1,194
0,3	0,591
0,15	0,306
0,08	0,163

### 3.1.9 S100A-11

#### Příprava rekombinantního lidského S100A-11

Jako standard byl použit rekombinantní lidský S100A-11, produkovaný v *E. coli* ( $M_r$  12,98 kDa, obsahující 105 AMK zbytků lidského S100A-11 a 10 AMK zbytků His - Tag). Čistota proteinu byla analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE, obr. 16). Koncentrace rekombinantního S100A-11 byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchinovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich).



**Obr.16 .** Čistota proteinu byla ověřena elektroforézou(12 % homogenní gel, SDS PAGE, metoda: Laemmli, barvení gelu: Coomassie blue). V levé dráze je standard připravený z proteinů o relativních molekulových velikostech 14, 21, 31, 45, 66 a 97 kDa; v pravé dráze je izolovaný rekombinantní lidský S100A-11 (redukováný a zahřátý vzorek a neredukovaný a nezahřátý vzorek, koncentrace 5  $\mu\text{g}/\text{dráhu}$ )

### **Provedení ELISA testu pro stanovení S100A-11**

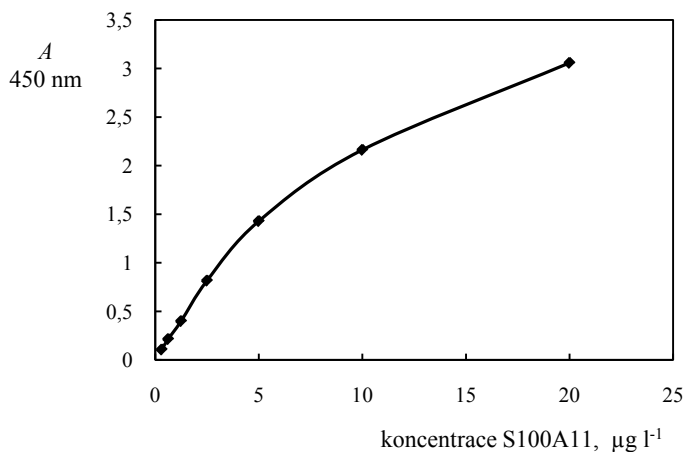
Byl navržen a sestaven s endvičový ELISA test pro kvantitativní stanovení S100A-11 v séru a plazmě. Byla použita mikrotitrační deska (Costar, High Binding), na kterou byla navázána specifická polyklonální ovčí protilátka proti lidskému S100A-11 (specRAHUAHuS100A-11 Antibody, Biovendor laboratorní medicína a.s.). Lyofilizovaná protilátka byla rekonstituována v ředicím roztoku (0,1M hydrogenuhličitanový pufr, pH 9,4) s výslednou koncentrací 2,0  $\text{mg l}^{-1}$  a do každé jamky mikrotitrační desky bylo dávkováno 0,1 ml protilátky.

Následovala inkubace 12 h při 4 °C a poté byla deska 1× promyta pomocí roztoku TBS-Tw (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; 0,05% Tween 20) na promývače Columbus washer od firmy Tecan. Nespecifická vazebná místa byla blokována roztokem 4% sacharózy a 0,5% BSA v TBS (0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,2; dávkováno 0,2 ml/jamku; inkubace 30 min při 25 °C). Po odsátí blokovacího roztoku bylo na desku dávkováno 0,1 ml příslušného standardu nebo 3× ředěného vzorku séra a všechna měření provedena v dubletu. Standardy byly ředěny roztokem 1% BSA, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1  $\text{g l}^{-1}$ , Scantibodies) v TBS-Tw (pH 7,2) a vzorky byly ředěny pomocí roztoku 1,4% kaseinu, heterofilní blokovací reagentie (myší IgG, 1  $\text{g l}^{-1}$ , Scantibodies) v 0,15 M PBS (0,12 M NaCl, 0,03 M fosforečnan sodný, pH 7,3).

Následně byla deska inkubována 1 h při 25 °C za stálého třepání. Po 5násobném promytí desky promývacím roztokem TBS-Tw (0,35 ml) bylo

do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml roztoku konjugátu. Jako konjugát byla použita specifická ovčí polyklonální protilátka IgG s navázanou křenovou peroxidázou (detekční protilátka specRAHUAHuS100A-11, Biovondor laboratorní medicína a.s.; výsledná koncentrace protilátky  $0,15 \text{ mg l}^{-1}$ ) a deska opět inkubována 1 h při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Po promytí desky (TBS-Tw) bylo do všech jamek desky dávkováno 0,1 ml substrátu TMB a reakční směs inkubována 10 min při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (TMB, (1,2 mM tetramethylbenzidin s obsahem 3 mM peroxidu vodíku, KPL). Reakce byla zastavena přidáním 0,2 M roztoku kyseliny sírové (0,1 ml/jamka) a vzniklé žluté zbarvení bylo změřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808). Intenzita žlutého zbarvení je přímo úměrná obsahu analytu ve vzorku. Koncentrace S100A-11 v neznámých vzorcích byly stanoveny z kalibrační křivky (obr. 17), která byla získána vynesením absorbancí standardů proti jejich známé koncentraci. V testu byla použita sada standardů 20, 10, 5, 2,5, 1,25, a  $0,31 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  v pufru s kaseinem, připravená naředěním rekombinantního lidského S100A-11 (tab. 11).



**Obr. 17.** Standardní křivka pro TFF-3 ELISA;  $A$  – Absorbance

**Tabulka 11**

S100A-11 – závislost hodnoty absorbancí standardů na jejich koncentraci

Koncentrace standardů v $\mu\text{g l}^{-1}$	Absorbance při 450 nm
20	3,059
10	2,163
5	1,429
3	0,816
1,3	0,399
0,6	0,214
0,31	0,106

## **3.2 Ověření analytických charakteristik a efektivity ELISA souprav pro stanovení vybraných molekul v pilotních klinických studiích**

### **3.2.1 Technika náběrů vzorků krve**

Náběr a zpracování vzorků pro všechna ELISA stanovení byl identický. Odběr krve pro jednotlivá stanovení byl proveden v polosedě z periferní žíly. Vzorky byly po odběru na 60 min uloženy při pokojové teplotě. Poté byla provedena centrifugace (10 min, 2000 g, 4 °C) odděleno sérum a zamraženo a uschováno při teplotě -80 °C.

### **3.2.2 Skupiny probandů a prováděná vyšetření**

Bylo provedeno celkem devět klinických studií, ve kterých bylo ověřováno eventuální klinické využití vybraných parametrů stanovených metodou ELISA. Klinické studie byly schváleny etickou komisí nemocnic Středomoravské nemocniční a.s.

#### **3.2.2.1 Osteokrin**

##### **Klinické testování ELISA metody (1)**

Byla provedena pilotní klinická studie za účelem ověření efektivity stanovení koncentrace osteokrinu v séru při hledání vztahů mezi kostním a energetickým metabolismem. Byla vyšetřena skupina 98 jedinců, pacientů metabolické ambulance Nemocnice Šternberk, kteří byli léčeni pro metabolický syndrom. Jako kontrolní soubor byla vybrána skupina zdravých osob, vyšetřených v rámci preventivních prohlídek (20 osob, neléčených ani nesledovaných pro žádné onemocnění). U všech jedinců byla vyšetřena hladina osteokrinu v séru a současně koncentrace cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu, TAG, intaktního proinzulinu, glukózy a vypočtena indexu Quicki (Kawada T: 2013).



### 3.2.2.2 PEDF

#### Klinické testování ELISA metody (2)

Byla provedena pilotní klinická studie za účelem ověření diagnostické efektivity stanovení koncentrace PEDF v séru u jedinců s rizikem rozvoje MetSy u kavkazské populace. Klinická studie probíhala v nemocnici Šternberk a bylo do ní zahrnuto celkem 112 osob, průměrného věku 65 let. Ze souboru bylo 40 mužů a 72 žen, u nichž bylo zjištěno zvýšené riziko pro vznik metabolického syndromu. Diagnóza metabolického syndromu byla stanovena na základě doporučení NCEP ATP III, která uvádí jako kritérium pro diagnostiku metabolického syndromu přítomnost minimálně tří nebo více kritérií u vyšetřovaných osob: *a)* obvod pasu u žen větší než 88 cm, u mužů větší než 102 cm; *b)* zvýšená koncentrace triacylglycerolů (rovna nebo vyšší než 1,7 mmol l<sup>-1</sup>); *c)* snížená koncentrace HDL cholesterolu u žen méně než 1,3 mmol l<sup>-1</sup> a u mužů méně než 1,0 mmol l<sup>-1</sup>; *d)* hypertenze ( $\geq 130/85$  mm Hg); *e)* zvýšená glykémie na lačno ( $\geq 5,6$  mmol l<sup>-1</sup>). Ze studie byli vyloučeni jedinci, u kterých byl diagnostikován chronický systémový zánět (zvýšení CRP nad 10 mg l<sup>-1</sup> a leukocytů za určené časové období), přítomnost diabetu léčeného perorálními antidiabetiky nebo inzulinem, jaterní onemocnění (zvýšení transamináz nad normální hodnotu v průběhu pěti měření), onemocnění ledvin s koncentrací kreatininu nad 130  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> a/nebo proteinúrie přesahující 0,5 g l<sup>-1</sup>. V rámci studie byla měřena koncentrace PEDF, inzulinu, glykémie na lačno, cholesterolu, LDL a HDL cholesterolu, triacylglycerolů a vypočten index Quicki (Kawada T: 2013).

### 3.2.2.3 VILIP-1

#### Klinické testování ELISA metody(3,4)

Byla provedena pilotní klinická studie za účelem ověření diagnostické efektivity stanovení koncentrace VILIP-1 v séru a likvoru při diagnostice postižení CNS. Bylo vyšetřeno 10 jedinců s mozkovou příhodou. Jako kontrolní skupina byl použit soubor 10 osob bez poruch metabolismu glukózy, neurologického nebo maligního onemocnění. U všech byla provedena lumbální punkce s analýzou buníček, vyšetření hematolikorové bariéry, lokální imunoreakce a známek zánětu pomocí specifických proteinů (indexy albuminu, imunoglobulinů, ApoAI, ApoB a CRP v séru a likvoru). U všech jedinců bylo provedeno i vyšetření mozku pomocí počítačové tomografie, ev. bylo doplněno vyšetřením nukleární magnetické rezonance. U všech osob byla stanovena koncentrace VILIP-1 v séru i likvoru (3).

Dále byla provedena pilotní studie na zjištění souvislosti mezi koncentrací VILIP-1 v séru a likvoru a ostatními markery poškození mozkových buněk u pacientů s mozkovou mrtvicí.

Bylo vyšetřeno celkem 17 zdravých jedinců a 16 jedinců s diagnózou mozkové mrtvice a navíc bylo u všech jedinců provedeno vyšetření vybraných sérových a likvorových parametrů, vyšetření CT a/nebo magnetická rezonance (4).

#### **3.2.2.4 Sekretagogin**

##### **Klinické testování ELISA metody (11,12)**

Byla provedeny dvě pilotní klinické studie; jedna za účelem ověření diagnostické efektivity stanovení koncentrace sekretagoginu u 98 pacientů s kraniotraumatem; druhá 686 fyziologických novorozenců. Jako kontrolní skupina pro studii osob s kraniotraumatem byla použita skupina 41 zdravých dárců. U novorozenců bylo vyšetřeno pH krve a stanoveno Apgar-skore. U osob kraniotraumatem byly vyšetřeny ještě pNF-H, GFAP i Hsp70 v séru.

#### **3.2.2.5 Dkk-1**

##### **Klinické testování ELISA metody (5,13)**

Byla provedena pilotní klinická studie za účelem ověření diagnostické efektivity stanovení koncentrace Dkk-1 v séru u pacientů s osteoporózou. Byly vyšetřeny dvě skupiny jedinců, pacientů metabolických a osteologických ambulancí v rámci Středomoravské nemocniční a.s., kteří byli sledováni pro podezření na osteopatie. Současně byla vyšetřena skupina zdravých osob v rámci preventivních prohlídek (kontrolní skupina). Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 11 pacientů uvedených ambulací, u kterých nebyla při dvoufotonové kostní denzitometrii (DEXa, přístroj Hologic 4500) zjištěna osteoporóza ani neměli zvýšenou kostní remodelaci odhadovanou stanovením běžných laboratorních ukazatelů. Do druhé skupiny bylo zařazeno 23 osob s osteoporózou verifikovanou pomocí DEXa (T skóre < 2,5 minimálně ve dvou lokalitách). U všech sledovaných osob byly vyšetřeny sérové hodnoty Dkk-1, PTH, osteokalcinu, kalcia, fosforu, hořčíku, kreatininu, kostního isoenzymu alkalické i kyselé fosfatázy 5b a močový index DPD/kreatinin.

### 3.2.2.6 Chemerin

#### Klinické testování ELISA metody (9,14)

Byla provedena pilotní klinická studie za účelem ověření diagnostické efektivity stanovení koncentrace chemerinu v séru při diagnostice metabolického syndromu. Klinická studie probíhala v nemocnici Šternberk v rozmezí leden 2007 až říjen 2007 a zahrnovala skupinu 50 zdravých jedinců, u kterých nebyla přítomna obezita, neužívali žádné léky a byli nekuřáci a skupinu 181 jedinců, kteří byli monitorováni pro vysoké riziko přítomnosti metabolického syndromu (MetSy). V rámci této skupiny bylo 122 jedinců bez diagnostikovaného MetSy a 59 jedinců s diagnostikovaným MetSy. Do skupiny s vysokým rizikem přítomnosti MetSy byli zařazeni jedinci s hypetriacylglycerémií, hyperglykémií nalačno, dyslipidémií, hypertenzí a obezitou. Ze studie byli vyřazeni jedinci s akutním nebo chronickým zánětem (anamnéza, zvýšená sérová koncentrace CRP  $>10\text{mg l}^{-1}$ , zvýšená koncentrace leukocytů v krvi), s diabetem léčeným perorálními antidiabetiky nebo inzulinem, plicním onemocněním se zvýšenou aktivitou transamináz ( $5\times$ nad referenční mez), onemocněním ledvin (kreatinin  $> 130\mu\text{mol l}^{-1}$  a/nebo proteinúrií přesahující hodnotu  $0,5\text{ g l}^{-1}$ ).

U všech vzorků byla stanovena koncentrace chemerinu v séru metodou ELISA, dále byl stanoven adiponektin, celkový cholesterol, triacylglyceroly, HDL cholesterol, LDL cholesterol, glukóza, kyselina močová, apolipoprotein A-I, apolipoprotein B, alanin-aminotransferáza (ALT), aspartát aminotransferáza (AST), inzulin. Dále byl vypočítán index rezistence k inzulinu Quicki a změřen obvod pasu (WC) a vypočtena hodnota Body Mass Indexu (BMI).

### **3.2.2.7 PSP-94**

#### **Klinické testování ELISA metody (15)**

Cílem pilotní klinické studie bylo ověření souvislosti mezi PSP-94, celkovým a volným PSA v séru u mužů osob s chronickou prostatitidou a jedinců po radikální prostatektomii pro karcinom prostaty (RAPPE).

Bylo vyšetřeno 121 mužů, pacientů urologické kliniky FN Olomouc. U všech byl stanoven PSP-94, PSA a u vybraných pacientů i volný PSA v séru. Všem bylo provedeno sonografické transrektální vyšetření prostaty.

### **3.2.2.8 TFF**

#### **Klinické testování ELISA metody (16, 24)**

Byla provedena pilotní klinická studie za účelem ověření diagnostické efektivity stanovení koncentrace TFF-1, TFF-2, TFF-3 v séru při diagnostice karcinomů endometria. Byl vyšetřen soubor 44 žen středního věku. U všech pacientů byly změřeny sérové koncentrace TFF-1, TFF-2, TFF-3, S100A-11, AIF-1 a Ca-125.

### **3.2.2.9 S100A-11**

#### **Klinické testování ELISA metody (24)**

Byla provedena pilotní klinická studie za účelem ověření diagnostické efektivity stanovení koncentrace AIF-1 a S100A-11 v séru při diagnostice karcinomů endometria. Byl vyšetřen soubor 44 žen středního věku. U všech pacientů byly změřeny sérové koncentrace TFF-1, TFF-2, TFF-3, S100A-11, AIF-1 a Ca-125.

### 3.2.3 Statistické zpracování dat

Data byla zpracována pomocí software Medcalc (MedCalc, Mariakerke, Belgium). Spojité veličiny jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka a medián, není-li uvedeno jinak (podle typu rozložení dat). Hladiny jednotlivých parametrů byly mezi skupinami porovnávány metodou analýzy rozptylu (ANOVA, Kruskal-Wallis, podle typu rozložení dat), ev. pomocí ROC analýzy. Koncentrace sledovaných veličin byly navzájem korelovány pomocí Spearmanova nebo Pearsonova korelačního koeficientu (podle typu rozložení dat). Kategoriální data byly porovnávány  $\chi^2$  testem. Při výpočtech bylo také využito regresních rovnic. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky signifikantní. Normalita byla hodnocena pomocí  $\chi^2$  testu nebo testu Kolmogorov-Smirnov.

### 3.2.4 Používané diagnostické soupravy

V rámci uvedených projektů byly využívány rutinní analytické soupravy IVD-CE výrobců Siemens HealthCare Diagnostics, Biovendor laboratorní medicína a.s., Roche Diagnostics, Radiometer Medical ApS. Analýzy byly prováděny na systémech Advia 1650 , Advia 1800, Immulite 2000, BNII, Advia Centaur XP (Siemens Healthcare Diagnostics, USA ), Cobas e411 (Roche Diagnostics, USA), DSX (Dynex Technologies, Inc., USA) a ABL 700, ABL 825 Flex (Radiometer Medical ApS, Denmark). Výrobce ELISA souprav, které nebyly cílem projektů, bylo vývojové oddělení Biovendor Laboratorní medicína a.s.

## 4. Výsledky

### 4.1 Ověření analytických charakteristik ELISA souprav pro stanovení vybraných molekul

Popis analytických charakteristik, jejich výpočtů a hodnocení je uveden v kapitole 1.2.3 Analytická charakteristika ELISA souprav. Pro přehlednost jsou v data v tabulkách uváděny ve zjednodušeném formátu.

#### 4.1.1. Osteokrin (1)

##### Analytická charakteristika metody ELISA

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace PEDF v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace osteokrinu. Vzorky sér od tří pacientů byly obohaceny o +4, +2 a +1  $\mu\text{g l}^{-1}$  osteokrinu. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 94 % (tab. 12). V testu linearit byly testovány dva sérové vzorky, které byly sériově ředěny 2 $\times$ , 4 $\times$ , 8 $\times$  ředícím roztokem, který obsahoval TBS (pH 7,2), 0,05% Tween 20 a 0,05% želatiny. Průměrná hodnota výtěžku byla 120 % (tab. 13).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků u dvou sérových vzorků a vyjádřena jako variační koeficient v sérii ( $n=5$ ) a mezilehlá preciznost mezi sériemi měření ( $n=8$ ). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla 9,4 a 3,4% (tab. 14 a tab. 15).

Mez detekce metody, představující nejnížší stanovitelnou koncentraci osteokrinu, činila 0,5  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace osteokrinu, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná absorbance slepého vzorku ( $n=16$ ) + 3 $\times$  směrodatná odchylka průměru slepého stanovení, a byla odečtena z kalibrační křivky osteokrinu). Mez stanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla 2  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 16).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze králíčího, kozího, ovčího, prasečího, myšího, koňského, křeččího, slepičího, hovězího a krysího vzorku séra. Byla zjištěna křížová reaktivita u opičího a kočičího séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský osteokrin (tab. 17).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení osteokrinu byl posuzován efekt rozmrazení/zamrazení (5 $\times$ ) a stabilita vzorků při teplotě 4 °C (tab. 18). Nebyl zjištěn vliv zamrazení/rozmrazení (5 $\times$ ) na koncentraci osteokrinu ve vzorcích.

Pokud byly vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci osteokrinu ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci 0,03%, respektive 0,05%)(viz tab.19).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci osteokrinu ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=10$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin) (viz tab. 20,obr. 18).

**Tabulka 12**

Osteokrin –metoda standardního přídávku (koncentrace vynásobené dil. faktorem 4×)

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	3,88	-	-
	4,0	18,96	20,00	94,7
	2,0	12,32	12,00	102,6
	1,0	6,80	8,00	85,1
<b>2</b>	-	28,40	-	-
	4,0	39,08	44,40	88,0
	2,0	34,64	36,40	95,2
	1,0	31,68	32,40	97,8

**Tabulka 13**

Osteokrin –test diluční linearity(koncentrace vynásobené dilučním faktorem 4×)

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	27,40	-	-
	2×	16,44	13,70	120,0
	4×	8,15	6,85	119,0
	8×	4,08	3,43	119,0
<b>2</b>	-	5,20	-	119,0
	2×	3,12	2,60	120,0
	4×	1,56	1,30	120,0
	8×	0,78	0,65	120,0

**Tabulka 14**

Osteokrin – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=5$ )  
(koncentrace vynásobené dilučním faktorem 4×)

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	13,21	1,29	9,8
<b>2</b>	21,52	1,91	8,9

**Tabulka 15**

Osteokrin – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
1	12,75	0,64	5,04
2	21,19	0,36	1,70

### Tabulka 16

Osteokrin – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=16$ )	0,021
SD	0,01
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,05
Mez detekce	$0,5 \mu\text{g l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	$2,0 \mu\text{g l}^{-1}$

### Tabulka 17

Osteokrin – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
psi	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	nebyla zjištěna
kočičí	nebyla zjištěna
opičí	nebyla zjištěna
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
krysí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna



**Tabulka 18**

Osteokrin – vliv rozmražení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	1×	8,40	13,90	11,65	6,91
	3×	8,93	13,10	11,95	6,32
	5×	8,26	9,31	16,06	7,03
<b>2</b>	1×	7,34	10,07	8,91	5,92
	3×	7,01	10,28	9,96	5,90
	5×	6,12	7,57	8,17	6,32
<b>3</b>	1×	7,50	14,33	11,55	11,32
	3×	7,73	15,27	12,62	10,93
	5×	7,85	14,39	9,12	8,01

**Tabulka 19**

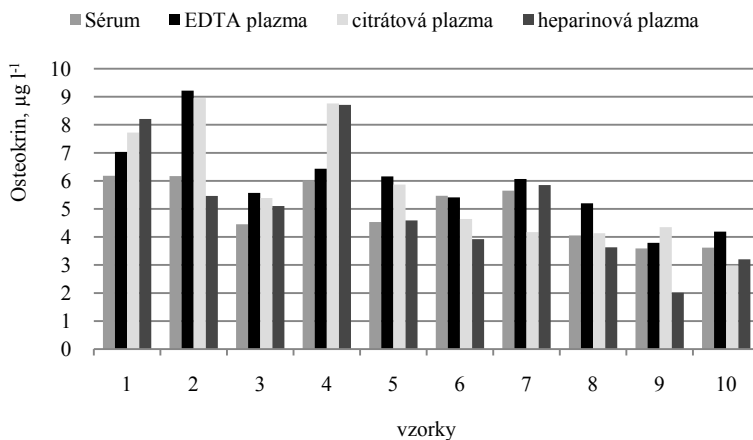
Osteokrin – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	- 20 °C	7,78	8,09	8,1	6,06
	2 – 8 °C, 1 den	8,87	10,21	8,7	6,43
	2 – 8 °C, 7 dní	8,1	8,87	8,83	6,65
<b>2</b>	- 20 °C	6,27	10,11	7,72	7,4
	2 – 8 °C, 1 den	7,62	8,42	8,09	7,01
	2 – 8 °C, 7 dní	7,01	7,89	7,17	6,39
<b>3</b>	- 20 °C	9,48	12,78	11,42	9,19
	2 – 8 °C, 1 den	9,45	14,06	9,87	8,77
	2 – 8 °C, 7 dní	7,89	11,32	8,91	6,34

**Tabulka 20**

Osteokrin – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	6,18	7,03	7,72	8,21
2	6,17	9,22	8,95	5,46
3	4,45	5,57	5,39	5,1
4	6,02	6,43	8,76	8,71
5	4,53	6,16	5,87	4,59
6	5,47	5,41	4,64	3,92
7	5,65	6,07	4,17	5,85
8	4,05	5,2	4,13	3,63
9	3,59	3,79	4,35	2,01
10	3,62	4,19	2,98	3,2
<b>Průměr</b>	<b>4,97</b>	<b>5,91</b>	<b>5,7</b>	<b>5,07</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>84,1</b>	<b>114,6</b>	<b>102,0</b>

**Obr. 18.** Vliv matrice vzorku na koncentraci Osteokrinu, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

## 4.1.2 PEDF

### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace PEDF v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace PEDF. Sérové vzorky od dvou pacientů (2,0 a 1,32 mg l<sup>-1</sup>) byly obohaceny o +7,32, +3,6 a +1,72mg l<sup>-1</sup> PEDF. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 101 % (tab. 21). V testu linearitly byly testovány další dva sérové vzorky (11,26 a 16,15 mg l<sup>-1</sup>), které byly sériově ředěny 2×, 4× a 8×, přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 97 % (tab. 22).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků v sérii měření ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ ) u tří sérových vzorků a vyjádřena jako variační koeficient. Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 % (tab. 23, tab. 24). Mez detekce metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci PEDF, byla 0,045 μg l<sup>-1</sup> (tato hodnota je vyjádřením koncentrace PEDF, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku ( $n=16$ ) + 3× směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky PEDF). Mez stanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla 198,8 μg l<sup>-1</sup> (tab. 25).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze králíčího, kozího, ovčího, prasečího, myšího, koňského, křeččího, slepičího, hovězího a krysího vzorku séra. Byla zjištěna křížová reaktivita u opičího a kočičího séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský PEDF (tab. 26).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení PEDF byl posuzován efekt rozmrazení/zamrazení (5×) a stabilita vzorků při teplotě 4 °C (tab. 27). Nebyl zjištěn vliv zamrazení/rozmrazení (5×) na koncentraci PEDF ve vzorcích. Pokud byly vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci PEDF ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina ε-aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci 0,03%, respektive 0,05%)(viz tab. 28).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci PEDF ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=10$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin) (viz tab. 29, obr. 19).

**Tabulka 21**

PEDF –metoda standardního přídatku

Vzorek	Přídavek	Změřeno (mg l <sup>-1</sup> )	Očekáváno (mg l <sup>-1</sup> )	Výtěžek Z/O(%)
<b>1</b>	-	2,00	-	-
	7,32	8,82	9,32	94,6
	3,60	5,68	5,60	101,4
	1,72	3,88	3,72	104,3
<b>2</b>	-	1,32	-	-
	7,32	8,44	8,64	97,7
	3,60	5,02	4,92	102,0
	1,72	3,14	3,04	103,3

**Tabulka 22**

PEDF –test diluční linearity

Vzorek	Ředění	Změřeno (mg l <sup>-1</sup> )	Očekáváno (mg l <sup>-1</sup> )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	11,26	-	-
	2×	5,65	5,63	100,4
	4×	2,64	2,82	93,9
	8×	1,44	1,41	102,3
<b>2</b>	-	16,15	-	-
	2×	8,04	8,08	99,6
	4×	3,74	4,04	92,5
	8×	1,92	2,02	95,3

**Tabulka 23**

PEDF – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření (n=8)

Vzorek	Průměr (mg l <sup>-1</sup> )	SD	CV (%)
<b>1</b>	4,1	0,12	2,92
<b>2</b>	5,6	0,23	4,05
<b>3</b>	6,61	0,25	3,73

**Tabulka 24**PEDF – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ )

Vzorek	Průměr (mg l <sup>-1</sup> )	SD	CV (%)
<b>1</b>	3,3	0,19	5,9
<b>2</b>	2,21	0,12	5,3
<b>3</b>	0,29	0,02	6,6

**Tabulka 25**

PEDF – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=16$ )	0,021
SD	0,01
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,05
Mez detekce	0,045 $\mu\text{g l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	0,360 $\text{mg l}^{-1}$

**Tabulka 26**

PEDF – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
psi	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	nebyla zjištěna
kočičí	<b>byla zjištěna</b>
opičí	<b>byla zjištěna</b>
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
krysí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna

**Tabulka 27**

PEDF – vliv rozmrazení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum(mg l <sup>-1</sup> )	Plazma (mg l <sup>-1</sup> )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	1×	9,8	11,0	9,9	10,0
	3×	13,2	10,7	8,3	10,7
	5×	11,0	12,7	9,2	9,9
<b>2</b>	1×	11,9	12,0	10,2	11,0
	3×	12,3	10,8	9,8	12,7
	5×	15,0	14,7	8,4	10,7
<b>3</b>	1×	9,0	9,3	8,1	9,3
	3×	10,5	8,2	8,4	8,6
	5×	10,9	10,0	9,1	9,7

**Tabulka 28**

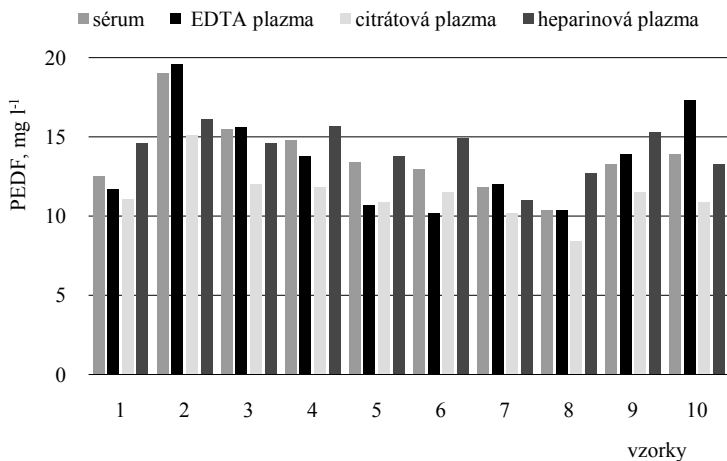
PEDF – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum (mg l <sup>-1</sup> )	Plazma (mg l <sup>-1</sup> )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	- 20 °C	15,5	13,0	11,9	12,2
	2 – 8°C, 1 den	13,2	11,6	10,2	10,2
	2 – 8°C, 7 dní	14,0	13,9	10,6	12,5
<b>2</b>	- 20 °C	9,7	9,9	6,8	8,8
	2 – 8°C, 1 den	10,0	8,7	6,6	9,5
	2 – 8°C, 7 dní	8,8	8,3	7,0	8,3
<b>3</b>	- 20 °C	12,9	12,4	10,9	11,6
	2 – 8°C, 1 den	11,7	11,3	9,6	11,4
	2 – 8°C, 7 dní	14,1	12,4	9,9	13,0

**Tabulka 29**

PEDF – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum (mg l <sup>-1</sup> )	Plazma (mg l <sup>-1</sup> )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	12,5	11,7	11,1	14,6
2	19,0	19,6	15,1	16,1
3	15,5	15,6	12,0	14,6
4	14,8	13,8	11,8	15,7
5	13,4	10,7	10,9	13,8
6	13,0	10,2	11,5	14,9
7	11,8	12,0	10,2	11,0
8	10,4	10,4	8,4	11,7
9	13,3	13,9	11,5	15,3
10	13,9	17,3	10,9	13,3
<b>Průměr</b>	<b>13,8</b>	<b>13,5</b>	<b>11,3</b>	<b>14,2</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>98,0</b>	<b>82,8</b>	<b>104,5</b>

**Obr. 19.** Vliv matrice vzorkuna koncentraci PEDF, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

### 4.1.3 VILIP-1(3)

#### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace VILIP-1 v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace VILIP-1. Vzorky séra od dvou pacientů byly obohaceny o 0,25, 0,66 1,48  $\mu\text{g l}^{-1}$  a jeden vzorek likvoru o 336,0, 884,0 a 1972,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  VILIP-1. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 104 % (tab. 30). V testu linearitě byly testovány další dva vzorky séra a jeden vzorek likvoru, které byly sériově ředěny 2 $\times$ , 4 $\times$  a 8 $\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 88,9 % (tab. 31).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků v sérii měření ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ ) u dvou sérových vzorků a jednoho vzorku likvoru avyžádřena jako variační koeficient. Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech < 10 % (tab. 32, tab. 33).

Mez detekce metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci VILIP-1, byla 0,027  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace VILIP-1, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorpance slepého vzorku ( $n=8$ ) + 3 $\times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky. Mez stanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla 0,081  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 34).

Ve ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze králičího, ovčího, prasečího, myšího, koňského, křeččího, slepičího, hovězího a krysího vzorku séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský VILIP-1 (tab. 35).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení VILIP-1 byl posuzován efekt rozmrazení/zamražení (5 $\times$ ) a stabilita vzorků při teplotě 4 °C (tab. 36). Nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení (5 $\times$ ) na koncentraci VILIP-1 ve vzorcích. Pokud byly vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci VILIP-1 ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci 0,03%, respektive 0,05%) (viz tab. 37).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci VILIP-1 ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=12$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin) (viz tab. 38, obr. 20).



**Tabulka 30**

VILIP-1 –metoda standardního přidavku

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>sérum 1</b>	-	1,91	-	-
	0,25	2,20	2,16	101,7
	0,66	2,68	2,57	104,0
	1,48	3,44	3,39	101,6
<b>sérum 2</b>	-	4,179	-	-
	0,25	4,377	4,43	98,8
	0,66	5,048	4,84	104,2
	1,48	5,669	5,66	100,2
<b>likvor 1</b>	-	2842,70	-	-
	336,0	3319,40	3178,70	104,4
	884,0	3996,80	3726,70	107,2
	1972,0	5104,50	4814,70	106,0

**Tabulka 31**

VILIP-1 –test diluční linearity

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>sérum 1</b>	-	212,04	-	-
	2×	91,60	106,02	86,4
	4×	46,41	53,01	87,5
	8×	21,02	26,51	79,3
<b>sérum 2</b>	-	5,15	-	-
	2×	2,42	2,58	94,1
	4×	1,22	1,29	94,6
	8×	0,63	0,64	98,2
<b>likvor 1</b>	-	2231,90	-	-
	2×	1092,70	1116,00	97,9
	4×	488,80	558,00	87,6
	8×	260,40	279,00	93,3

**Tabulka 32**VILIP-1 – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>sérum 1</b>	2,85	0,1	4,4
<b>sérum 2</b>	1,4	0,1	9,7
<b>likvor 1</b>	2112,5	131,5	6,2

**Tabulka 33**VILIP-1 – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>sérum 1</b>	2,95	0,13	4,45
<b>sérum 2</b>	1,39	0,08	5,46
<b>likvor 1</b>	2213,5	4,09	1,99

**Tabulka 34**

VILIP-1 – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=8$ )	0,0572
SD	0,0053
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,073
Mez detekce	$0,027 \mu\text{g l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	$0,081 \mu\text{g l}^{-1}$

**Tabulka 35**

VILIP-1 – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
kočičí	<b>byla zjištěna</b>
psí	nebyla zjištěna
kozí	<b>byla zjištěna</b>
křeččí	nebyla zjištěna
koňské	nebyla zjištěna
opičí	nebyla zjištěna
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna

**Tabulka 36**

VILIP-1 – vliv rozmražení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
<b>1</b>	1×	4,9
	3×	5,0
	5×	5,2
<b>2</b>	1×	3,8
	3×	4,0
	5×	4,0
<b>3</b>	1×	3,3
	3×	3,4
	5×	3,6

**Tabulka 37**

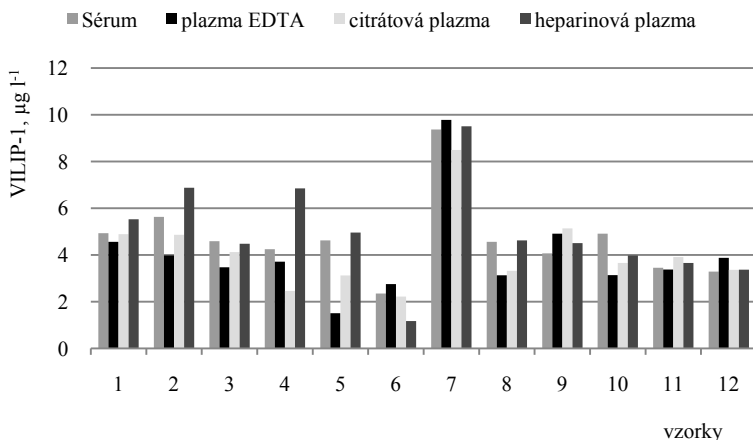
VILIP-1 – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
<b>1</b>	- 20 °C	5,06
	2 – 8 °C, 1 den	5,00
	2 – 8 °C, 7 dní	5,14
<b>2</b>	- 20 °C	3,73
	2 – 8 °C, 1 den	4,00
	2 – 8 °C, 7 dní	3,92
<b>3</b>	- 20 °C	3,51
	2 – 8 °C, 1 den	3,28
	2 – 8 °C, 7 dní	3,14

**Tabulka 38**

VILIP-1 – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	4,93	4,56	4,89	5,53
2	5,63	3,98	4,86	6,88
3	4,59	3,47	4,12	4,48
4	4,25	3,71	2,46	6,85
5	4,62	1,51	3,12	4,96
6	2,35	2,75	2,22	1,17
7	9,37	9,78	8,49	9,51
8	4,56	3,13	3,32	4,62
9	4,07	4,91	5,14	4,51
10	4,91	3,14	3,66	3,98
11	3,45	3,38	3,91	3,66
12	3,29	3,88	3,36	3,37
<b>Průměr</b>	<b>4,67</b>	<b>4,02</b>	<b>4,13</b>	<b>5,13</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>86,0</b>	<b>88,5</b>	<b>106,2</b>



**Obr.20.** Vliv matrice vzorku na koncentraci VILIP-1, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

#### 4.1.4 SCGN(11)

##### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace SCGN v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace SCGN. Sérové vzorky od dvou pacientů (323,31 a 653,31 ng l<sup>-1</sup>) byly obohaceny o +375, +750 a +1500 ng l<sup>-1</sup> SCGN. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 92 % (tab. 39). V testu linearitě byly testovány další dva sérové vzorky (1756,68 a 1027,59 ng l<sup>-1</sup>), které byly sériově ředěny 2×, 4× a 8×, přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 107 % (tab. 40).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků v sérii měření ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=8$ ) u dvou sérových vzorků a vyjádřena jako variační koeficient. Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 % (tab. 41, tab. 42).

Mez detekce metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci SCGN, byla 11 ng l<sup>-1</sup> (tato hodnota je vyjádřením koncentrace SCGN, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku

( $n=16$ ) +  $3 \times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky SCGN). Mez stanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla  $33 \text{ ng l}^{-1}$  (tab. 43).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení SCGN byl posuzován efekt rozmrazení/zamražení ( $5 \times$ ) a stabilita vzorků při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (tab. 44). Nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5 \times$ ) na koncentraci SCGN ve vzorcích. Pokud byly vzorky skladovány při teplotě  $2\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci SCGN ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci  $0,03\%$ , respektive  $0,05\%$ ) (viz tab. 45). Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci SCGN ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=10$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin) (viz tab. 46, obr. 21).

**Tabulka 39**

SCGN –metoda standardního přidavku

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\text{ng l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\text{ng l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	323,3	-	-
	1500,0	1543,2	1823,3	84,6
	750,0	940,5	1073,3	87,6
	375,0	652,7	698,3	93,5
<b>2</b>	-	653,3	-	-
	1500,0	2061,6	2153,3	95,7
	750,0	1313,3	1403,3	93,6
	375,0	969,6	1028,3	94,3

**Tabulka 40**

SCGN –test diluční linearity

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\text{ng l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\text{ng l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	1756,7	-	-
	2x	818,1	878,3	93,1
	4x	455,9	439,2	103,8
	8x	239,7	219,6	109,1
<b>2</b>	-	1027,6	-	-
	2x	541,5	513,8	105,4
	4x	295,2	256,9	114,9
	8x	149,1	128,5	116,1

**Tabulka 41**SCGN – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )

Vzorek	Průměr (ng l <sup>-1</sup> )	SD	CV (%)
1	966,4	58,2	6
2	870,9	62,9	7,2

**Tabulka 42**SCGN – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ )

Vzorek	Průměr (ng l <sup>-1</sup> )	SD	CV (%)
1	300,9	19,8	6,6
2	633,74	40,4	6,4

**Tabulka 43**

SCGN – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=16$ )	0,060
SD	0,0073
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,082
Mez detekce	11 ng l <sup>-1</sup>
Mez stanovitelnosti	33 ng l <sup>-1</sup>

**Tabulka 44**

SCGN – vliv rozmražení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum (ng l <sup>-1</sup> )
1	1×	343,9
	3×	310,3
	5×	348,2
2	1×	22,5
	3×	30,6
	5×	33,4
3	1×	968,6
	3×	903,7
	5×	1127,2

**Tabulka 45**

SCGN – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

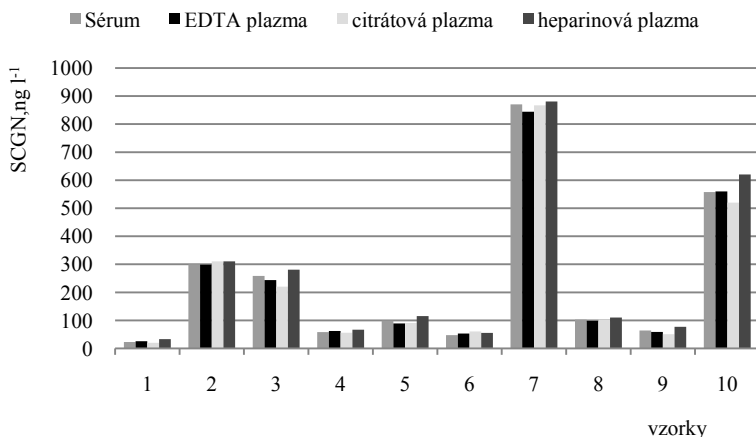
Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum (ng l <sup>-1</sup> )
<b>1</b>	- 20 °C	1302,9
	2 – 8 °C, 1 den	1020,2
	2 – 8 °C, 7 dní	829,7
<b>2</b>	- 20 °C	300,7
	2 – 8 °C, 1 den	329,9
	2 – 8 °C, 7 dní	318,7
<b>3</b>	- 20 °C	26,1
	2 – 8 °C, 1 den	24,3
	2 – 8 °C, 7 dní	31,5

**Tabulka 46**

SCGN – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum (ng l <sup>-1</sup> )	Plazma (ng l <sup>-1</sup> )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	23,1	25,4	20,0	33,2
2	300,1	298,7	310,5	310,5
3	258,3	244,0	220,6	280,7
4	58,5	62,1	55,7	66,7
5	99,4	88,9	90,5	115,2
6	47,2	53,2	60,5	55,1
7	870,4	844,0	867,0	880,9
8	102,8	98,0	103,0	110,4
9	63,9	59,0	51,0	77,0
10	557,9	560,0	520,0	620,2
<b>Průměr</b>	<b>238,2</b>	<b>233,3</b>	<b>229,9</b>	<b>255,0</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>98</b>	<b>96,5</b>	<b>107,1</b>





**Obr. 21.** Vliv matrice vzorku na koncentraci SCGN, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

#### 4.1.5 Dkk-1(5)

##### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace Dkk-1 v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace Dkk-1. Vzorky séra od dvou pacientů (o koncentraci Dkk-1 2,19  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respektive 3,29  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) byly obohaceny o +0,25, +0,5 a +1,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  rekombinantního Dkk-1. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 95 % (tab. 47). V testu linearit byly testovány dva vzorky séra (o koncentraci Dkk-1 3,49  $\mu\text{g l}^{-1}$  a 3,62  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), které byly sériově ředěny ředícím roztokem (TBS a 0,01% Thimerosal) 10 $\times$ , 20 $\times$ , 40 $\times$  a 80 $\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 93 % (tab. 48).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků měření v sérii ( $n=8$ ) a mezilehlá preciznost mezi sériemi měření ( $n=6$ ) a byla vyjádřena jako variační koeficient. Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 % (tab. 49, 50).

Mez detekce metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci Dkk-1, činila 0,01  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace Dkk-1 odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná absorbance slepého

vzorku ( $n=10$ ) +  $3\times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky Dkk-1). Mez stanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla  $0,03 \mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 51).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze králičího, koziho, ovčího, prasečího, myšího, koňského, křeččího, slepičího, krysiho a hovězího séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský Dkk-1 (tab. 52).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení Dkk-1 byl posuzován efekt rozmrazení/zamražení ( $5\times$ ) a stabilita vzorků při teplotě  $4^\circ\text{C}$ . Nebyl zjištěn vliv zamrazení/rozmrazení ( $5\times$ ) na koncentraci Dkk-1 ve vzorcích (tab. 53). Pokud byly vzorky skladovány při teplotě  $2-8^\circ\text{C}$  po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci Dkk-1 ve vzorcích (tab. 54). Na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci  $0,03\%$ , respektive  $0,01\%$ .

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci Dkk-1 ve vzorku byly porovnány ( $n=10$ ) vzorky séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin)(viz tab. 55, obr. 22). Na základě porovnání poměrů pro sérum a plazmu bylo doporučeno používat při stanovení Dkk-1 metodou ELISA jako materiál pouze lidské sérum.

#### Tabulka 47

Dkk-1 –metoda standardního přidavku (koncentrace vynásobené dil. faktorem  $3\times$ )

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
1	-	2,19	-	-
	1,0	6,20	6,19	100,1
	0,5	3,88	4,19	92,5
	0,25	2,96	3,19	92,6
2	-	3,29	-	-
	1,0	6,81	7,29	93,4
	0,5	4,82	5,29	91,2
	0,25	4,18	4,29	97,3

**Tabulka 48**

Dkk-1 – test diluční linearity (koncentrace vynásobené dil. faktorem 3×)

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	3,62	-	-
	2×	1,70	1,81	93,6
	4×	0,84	0,91	93,2
	8×	0,43	0,45	94,5
<b>2</b>	-	3,50	-	-
	2×	1,63	1,75	93,4
	4×	0,77	0,87	88,3
	8×	0,42	0,44	96,1

**Tabulka 49**Dkk-1 – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )  
(koncentrace vynásobené dil. faktorem 3×)

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	6,3	0,3	8,4
<b>2</b>	3,5	0,2	5,9

**Tabulka 50**Dkk-1 – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření  
( $n=6$ ) (koncentrace vynásobené dil. faktorem 3×)

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	1,0	2,6	0,15
<b>2</b>	2,0	1,8	0,16

**Tabulka 51**

Dkk-1 – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=10$ )	0,044
SD	0,009
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,071
Mez detekce	0,01 $\mu\text{g l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	0,03 $\mu\text{g l}^{-1}$

**Tabulka 52**

Dkk-1 – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
kočičí	nebyla zjištěna
psí	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	nebyla zjištěna
koňské	nebyla zjištěna
opičí	nebyla zjištěna
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna

**Tabulka 53**

Dkk-1 – vliv rozmražení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
<b>1</b>	1×	3,0
	3×	3,5
	5×	3,0
<b>2</b>	1×	2,6
	3×	2,6
	5×	3,0
<b>3</b>	1×	3,2
	3×	3,6
	5×	3,3

**Tabulka 54**

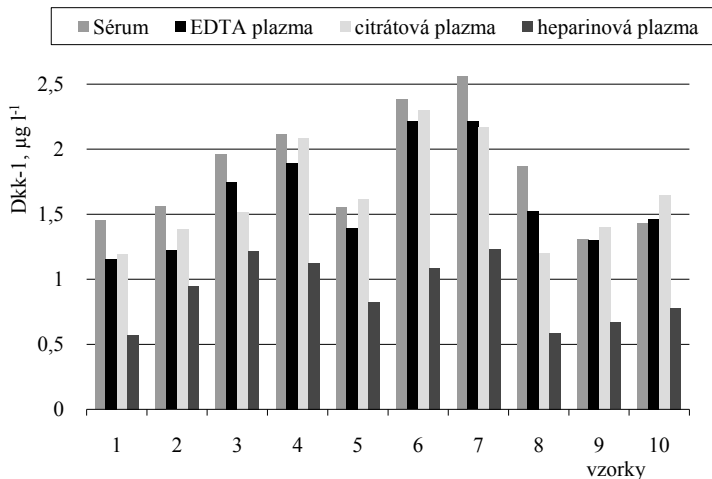
Dkk-1 – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
<b>1</b>	- 20 °C	1,1
	2 – 8 °C, 1 den	1,3
	2 – 8 °C, 7 dní	1,3
<b>2</b>	- 20 °C	1,6
	2 – 8 °C, 1 den	1,5
	2 – 8 °C, 7 dní	1,7
<b>3</b>	- 20 °C	1,5
	2 – 8 °C, 1 den	1,9
	2 – 8 °C, 7 dní	1,7

**Tabulka 55**

Dkk-1 – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	1,5	1,2	1,2	0,6
2	1,6	1,2	1,4	1,0
3	2,0	1,7	1,5	1,2
4	2,1	1,9	2,1	1,1
5	1,6	1,4	1,6	0,8
6	2,4	2,2	2,3	1,1
7	2,6	2,2	2,2	1,2
8	1,9	1,5	1,2	0,6
9	1,3	1,3	1,4	0,7
10	1,4	1,5	1,6	0,8
<b>Průměr</b>	<b>1,8</b>	<b>1,6</b>	<b>1,7</b>	<b>0,9</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>88,6</b>	<b>90,7</b>	<b>49,7</b>



**Obr. 22.** Vliv matrice vzorku na koncentraci Dkk-1, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

## 4.1.6 Chemerin

### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace chemerinu v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přidavku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace chemerinu. Sérové vzorky od dvou pacientů (4,22 a 3,64  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) byly obohaceny o +1, +2 a +4  $\mu\text{g l}^{-1}$  chemerinu. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 96 % (tab. 56). V testu linearit byly testovány další dva sérové vzorky (6,7 a 4,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), které byly sériově ředěny 2 $\times$ , 4 $\times$  a 8 $\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 103 % (tab. 57).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků měření sérii ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=6$ ) a vyjádřena jako variační koeficient (tab. 58, tab. 59). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 %.

Mez detekce metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci chemerinu, byla 0,1  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace chemerinu,

odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku ( $n=10$ ) +  $3 \times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky chemerinu). Mez stanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 60).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze králíčího, kozího, ovčího, prasečího, myšího, koňského, křeččího, slepičího, hovězího a krysího vzorku séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský chemerin (tab. 61).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení chemerinu byl posuzován efekt rozmražení/zamražení ( $5 \times$ ) a stabilita vzorků při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5 \times$ ) na koncentraci chemerinu ve vzorcích (tab. 62). Pokud byly vzorky skladovány při teplotě  $2\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci chemerinu ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci  $0,03\%$ , respektive  $0,05\%$ ) (viz tab. 63).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci chemerinu ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=10$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin). Výsledky jsou uvedeny v tab. 64 a obr. 23.

### Tabulka 56

Chemerin –metoda standardního přídávku  
(koncentrace vynásobené dil. faktorem  $100 \times$ )

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	211,0	-	-
	4,0	416,5	411,0	101,3
	2,0	316,0	311,0	101,6
	1,0	247,5	261,0	94,8
<b>2</b>	-	182,0	-	-
	4,0	354,0	382,0	92,7
	2,0	282,0	282,0	100,0
	1,0	204,5	232,0	88,1

**Tabulka 57**

Chemerin – test diluční linearity (koncentrace vynásobené dil. faktorem 100×)

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	225,0	-	-
	2×	115,0	112,5	102,2
	4×	60,0	56,3	106,7
	8×	30,0	28,1	106,7
<b>2</b>	-	335,0	-	-
	2×	170,0	167,5	101,5
	4×	85,0	83,8	101,5
	8×	42,0	41,9	100,3

**Tabulka 58**Chemerin – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )  
(koncentrace vynásobené dil. faktorem 50×)

Vzorek	Průměr ( $\text{mg l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	3,6	0,18	5,07
<b>2</b>	5,28	0,37	6,97

**Tabulka 59**Chemerin – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=6$ )  
(koncentrace vynásobené dil. faktorem 50×)

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	140,6	11,6	5,07
<b>2</b>	222,7	15,5	6,9

**Tabulka 60**

Chemerin – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=10$ )	0,0321
SD	0,0075
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times \text{SD}$	0,0546
Mez detekce	$0,10 \mu\text{g l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	$10,0 \mu\text{g l}^{-1}$



**Tabulka 61**

Chemerin – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
psi	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	nebyla zjištěna
koňské	nebyla zjištěna
opičí	nebyla zjištěna
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
krysí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna

**Tabulka 62**

Chemerin – vliv rozmražení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	1×	215	235	195	245
	3×	200	245	185	330
	5×	220	160	205	295
<b>2</b>	1×	155	185	140	205
	3×	160	180	160	195
	5×	160	170	140	145
<b>3</b>	1×	215	253	190	193
	3×	210	200	160	155
	5×	235	198	115	150

**Tabulka 63**

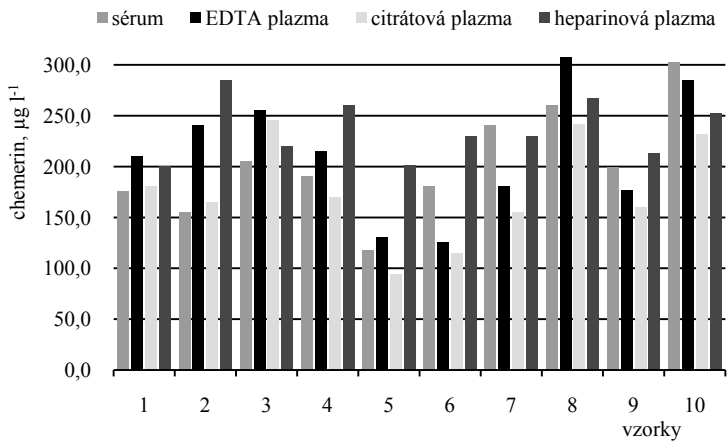
Chemerin – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	- 20 °C	210	230	180	215
	2 – 8 °C, 1 den	240	255	180	240
	2 – 8 °C, 7 dní	230	240	210	235
<b>2</b>	- 20 °C	270	260	235	225
	2 – 8 °C, 1 den	280	255	225	235
	2 – 8 °C, 7 dní	215	260	200	210
<b>3</b>	- 20 °C	330	240	160	235
	2 – 8 °C, 1 den	320	215	135	230
	2 – 8 °C, 7 dní	325	205	123	230

**Tabulka 64**

Chemerin – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	175,0	210,0	180,0	200,0
2	155,0	240,0	165,0	285,0
3	205,0	255,0	245,0	220,0
4	190,0	215,0	170,0	260,0
5	117,5	130,0	93,5	201,5
6	180,0	125,0	115,0	230,0
7	240,0	180,0	155,0	230,0
8	260,5	307,0	241,0	267,0
9	199,0	176,5	160,0	212,5
10	302,5	285,0	231,0	252,5
<b>Průměr</b>	<b>202,5</b>	<b>212,4</b>	<b>175,6</b>	<b>235,9</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>105</b>	<b>87</b>	<b>116</b>



**Obr. 23.** Vliv matrice vzorku na koncentraci Chemerinu, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

## 4.1.7 PSP-94

### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace PSP-94 v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace PSP-94. Sérové vzorky od dvou pacientů (8,9 a 16,7  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) byly obohaceny o +1, +2 a +4  $\mu\text{g l}^{-1}$  PSP-94. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 94,4 % (tab.65). V testu linearitě byly testovány další dva sérové vzorky (30,8 a 38,2  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), které byly sériově ředěny 2 $\times$ , 4 $\times$  a 8 $\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 104,2 % (tab.66).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků měření v sérii ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=8$ ) a vyjádřena jako variační koeficient (tab. 67, tab. 68). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 %.

Mez detekce metody, představující nejnížší stanovitelnou koncentraci PSP-94, byla 0,12  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace PSP-94, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku ( $n=16$ ) + 3 $\times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky PSP-94). Mez stanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla 0,6  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 69).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze králíčího, kozího, ovčího, prasečího, myšího, koňského, křeččího, kočičího, hovězího a krysího vzorku séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský PSP-94 (tab. 70).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení PSP-94 byl posuzován efekt rozmrazení/zamražení (5 $\times$ ) a stabilita vzorků při teplotě 4 °C. Nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení (5 $\times$ ) na koncentraci PSP-94 ve vzorcích (tab. 71). Pokud byly vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci PSP-94 ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselinaε-aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci 0,03%, respektive 0,05%) (viz tab. 72).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci PSP-94 ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=10$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin). Výsledky jsou uvedeny v tab. 73, obr. 24.

**Tabulka 65**

PSP-94 –metoda standardního přídávku(koncentrace vynásobené dil. faktorem 5×)

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	8,9	-	-
	4,0	26,1	28,9	90,4
	2,0	17,8	18,9	94,0
	1,0	12,6	13,9	90,6
<b>2</b>	-	16,7	-	-
	4,0	34,2	36,7	93,0
	2,0	27,3	26,7	102,3
	1,0	20,9	21,7	96,0

**Tabulka 66**

PSP-94 –test diluční linearity(koncentrace vynásobené dil. faktorem 5×)

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	30,8	-	-
	2×	15,0	15,4	97,6
	4×	8,9	7,7	116,0
	8×	3,7	3,9	95,8
<b>2</b>	-	38,2	-	-
	2×	18,4	19,1	96,3
	4×	10,8	9,6	112,9
	8×	5,1	4,8	106,8

**Tabulka 67**PSP-94 – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )

(koncentrace vynásobené dil. faktorem 5×)

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	14,0	1,0	7,0
<b>2</b>	18,5	1,1	5,9

**Tabulka 68**

PSP-94 – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=8$ )  
(koncentrace vynásobené dil. faktorem 5×)

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
1	14,6	0,8	5,3
2	24,2	1,2	4,9

**Tabulka 69**

PSP-94 – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=16$ )	0,027
SD	0,007
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times \text{SD}$	0,048
Mez detekce	$0,12 \mu\text{g l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	$0,6 \mu\text{g l}^{-1}$

**Tabulka 70**

PSP-94 – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
kočičí	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	nebyla zjištěna
opičí	nebyla zjištěna
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
krysí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna
psí	nebyla zjištěna

**Tabulka 71**

PSP-94 – vliv rozmražení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
<b>1</b>	1×	19,5
	3×	21,4
	5×	19,8
<b>2</b>	1×	19,9
	3×	17,8
	5×	19,0
<b>3</b>	1×	9,9
	3×	11,6
	5×	9,7

**Tabulka 72**

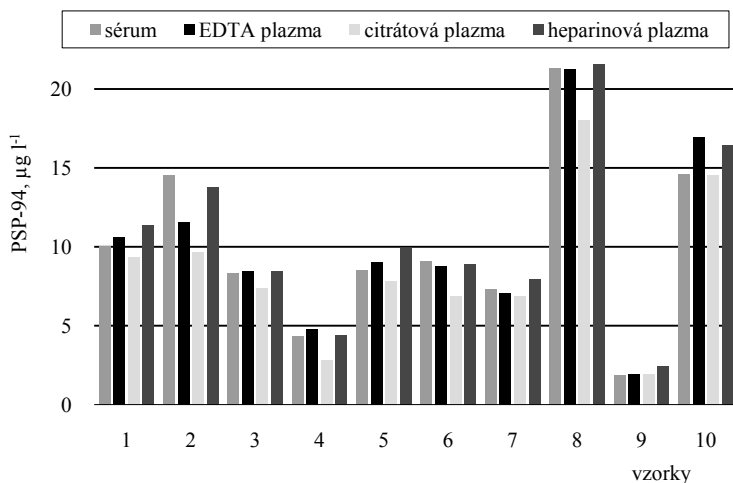
PSP-94 – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	- 20 °C	8,4	9,8	9,4	8,8
	2 – 8 °C, 1 den	9,8	9,8	9,6	9,7
	2 – 8 °C, 7 dní	8,4	10,0	10,3	9,2
<b>2</b>	- 20 °C	12,0	10,4	11,6	9,4
	2 – 8 °C, 1 den	10,3	12,2	11,7	12,5
	2 – 8 °C, 7 dní	12,4	11,2	13,2	10,3
<b>3</b>	- 20 °C	20,2	22,8	24,7	22,0
	2 – 8 °C, 1 den	23,1	23,1	22,2	18,0
	2 – 8 °C, 7 dní	20,6	26,0	27,5	24,1

**Tabulka 73**

PSP-94 – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	10,1	10,6	9,4	11,4
2	14,6	11,6	9,7	13,8
3	8,3	8,5	7,4	8,5
4	4,3	4,8	2,9	4,4
5	8,5	9,1	7,8	10,0
6	9,1	8,8	6,9	8,9
7	7,3	7,1	6,9	8,0
8	21,4	21,3	18,0	21,6
9	1,9	2,0	1,9	2,4
10	14,6	17,0	14,6	16,4
<b>Průměr</b>	<b>10,0</b>	<b>10,1</b>	<b>8,6</b>	<b>10,5</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>100,5</b>	<b>85,3</b>	<b>105,3</b>

**Obr. 24.** Vliv matrice vzorku na koncentraci PSP-94, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně



## 4.1.8 TFF

### 4.1.8.1 TFF-1

#### **Analytická charakteristika ELISA metody**

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace TFF-1 v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace TFF-1. Sérové vzorky od čtyř pacientů (1,13; 2,66; 7,01 a 2,92  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) byly obohaceny o +1, +2 a +4  $\mu\text{g l}^{-1}$  rekombinantního TFF-1, naředěny 5 $\times$  dilučním pufrům a analyzovány. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 106,3 % (tab. 74). V testu linearitě byly testovány další čtyři sérové vzorky (17,20; 18,39; 18,28 a 19,19  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), které byly naředěny 5 $\times$  dilučním pufrům a poté dále sériově ředěny 2 $\times$ , 4 $\times$  a 8 $\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 102,0 % (tab. 75).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků měření v sérii ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ ) a vyjádřena jako variační koeficient (tab. 76, tab. 77). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 %.

Mez detekce metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci TFF-1, byla 0,019  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace TFF-1, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku ( $n=16$ ) + 3 $\times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky TFF-1). Mezstanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla 0,095  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 78).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze králíčího, kozího, ovčího, prasečího, koňského, křeččího, kočičího, hovězího a krysího vzorku séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský TFF-1 (tab. 79).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení TFF-1 byl posuzován efekt rozmrazení/zamrazení (5 $\times$ ) a stabilita vzorků při teplotě 4 °C. Nebyl zjištěn vliv zamrazení/rozmrazení (5 $\times$ ) na koncentraci TFF-1 ve vzorcích (tab. 80). Pokud byly vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci TFF-1 ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci 0,03%, respektive 0,05%) (viz tab. 81).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci TFF-1 ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=10$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin). Výsledky jsou uvedeny v tab. 82, obr. 25.

**Tabulka 74**

TFF-1 –metoda standardního přídatku

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	1,13	-	-
	1,00	1,88	2,13	88,0
	2,00	3,13	3,13	100,1
	4,00	5,32	5,13	103,7
<b>2</b>	-	2,66	-	-
	1,00	3,83	3,66	104,6
	2,00	5,24	4,66	112,4
	4,00	7,64	6,66	114,8
<b>3</b>	-	7,00	-	-
	1,00	8,69	8,00	108,6
	2,00	9,54	9,00	106,0
	4,00	12,42	11,00	112,9
<b>4</b>	-	2,92	-	-
	1,00	3,87	3,92	98,8
	2,00	5,50	4,92	111,7
	4,00	7,91	6,92	114,3

**Tabulka 75**

TFF-1 –test diluční linearity

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	17,20	-	-
	2×	10,38	8,60	120,7
	4×	4,58	4,30	106,6
	8×	2,08	2,15	96,7
<b>2</b>	-	18,39	-	-
	2×	9,66	9,19	105,1
	4×	4,58	4,60	99,5
	8×	2,14	2,30	93,1
<b>3</b>	-	18,28	-	-
	2×	10,26	9,14	112,2
	4×	4,52	4,57	98,9
	8×	2,03	2,29	88,9
<b>4</b>	-	19,19	-	-
	2×	10,05	9,60	104,8
	4×	4,94	4,80	102,9
	8×	2,27	2,40	94,7

**Tabulka 76**TFF-1 – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	7,9	0,1	7,31
<b>2</b>	13,5	0,2	8,2

**Tabulka 77**TFF-1 – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	2,0	0,08	3,95
<b>2</b>	10,25	0,41	4,05

**Tabulka 78**

TFF-1 – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=16$ )	0,003
SD	0,001
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,006
Mez detekce	0,019 $\mu\text{g l}^{-1}$
Mez stanovitelnosti	0,095 $\mu\text{g l}^{-1}$

**Tabulka 79**

TFF-1 – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
kočičí	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	nebyla zjištěna
koňské	nebyla zjištěna
opičí	nebyla zjištěna
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
krysí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna

**Tabulka 80**

TFF-1 – vliv rozmražení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	1×	1,2	1,4	1,4	1,2
	3×	1,2	1,4	1,5	1,2
	5×	1,3	1,4	1,5	1,3
<b>2</b>	1×	0,7	1,3	0,9	0,9
	3×	0,7	1,3	1,0	0,9
	5×	0,7	1,3	0,8	0,9
<b>3</b>	1×	0,5	0,6	0,5	0,6
	3×	0,4	0,6	0,5	0,6
	5×	0,4	0,6	1,5	0,6

**Tabulka 81**

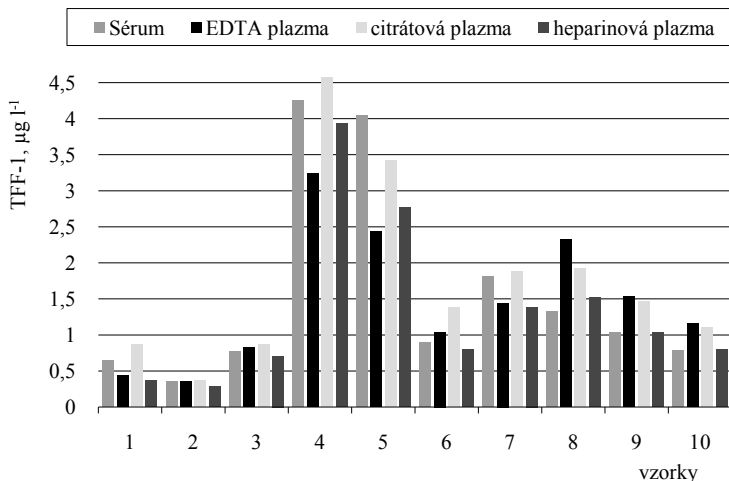
TFF-1 – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	- 80 °C	3,9	3,0	4,1	3,7
	2 – 8 °C, 1 den	4,1	3,4	4,0	3,4
	2 – 8 °C, 7 dní	4,3	3,8	4,1	3,5
<b>2</b>	- 80 °C	0,7	0,9	0,8	0,6
	2 – 8 °C, 1 den	0,7	0,9	0,8	0,5
	2 – 8 °C, 7 dní	0,8	0,9	0,8	0,5
<b>3</b>	- 80 °C	3,2	2,7	3,3	2,6
	2 – 8 °C, 1 den	3,4	2,7	3,3	2,4
	2 – 8 °C, 7 dní	3,5	2,9	3,2	2,5

**Tabulka 82**

TFF-1 – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	0,6	0,4	0,9	0,4
2	0,4	0,4	0,4	0,3
3	0,8	0,8	0,9	0,7
4	4,3	3,2	4,6	3,9
5	4,0	2,4	3,4	2,8
6	0,9	1,0	1,4	0,8
7	1,8	1,4	1,9	1,4
8	1,3	2,3	1,9	1,5
9	1,0	1,5	1,5	1,0
10	0,8	1,2	1,1	0,8
<b>Průměr</b>	<b>1,6</b>	<b>1,5</b>	<b>1,8</b>	<b>1,4</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>94</b>	<b>112</b>	<b>88</b>



**Obr. 25.** Vliv matrice vzorku na koncentraci TFF-1, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

#### 4.1.8.2 TFF-2

##### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace TFF-2 v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace TFF-2. Sérové vzorky od čtyř pacientů (3,01; 4,31; 2,78 a 4,03  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) byly obohaceny o +2, +5 a +10  $\mu\text{g l}^{-1}$  rekombinantního TFF-2, naředěny 5 $\times$  dilučním pufrem a analyzovány. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 98,9 % (tab. 83). V testu linearit byly testovány další čtyři sérové vzorky (4,59; 2,51; 3,60 a 44,04  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), které byly naředěny 5 $\times$  dilučním pufrem a poté dále sériově ředěny 2 $\times$ , 4 $\times$  a 8 $\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 97,4 % (tab. 84).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků měření v sérii ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ ) a vyjádřena jako variační koeficient (tab. 85, tab. 86). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 %.

Mez detekce metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci TFF-2, byla 0,044  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace TFF-2, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku

( $n=16$ ) +  $3 \times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky TFF-2). Mezstanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla  $0,22 \mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 87).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze kozího, ovčího, prasečího, koňského, křeččího, kočičího, hovězího a krysího vzorku séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský TFF-2 (tab. 88).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení TFF-2 byl posuzován efekt rozmražení/zamražení ( $5 \times$ ) a stabilita vzorků při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení ( $5 \times$ ) na koncentraci TFF-2 ve vzorcích (tab. 89). Pokud byly vzorky skladovány při teplotě  $2\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci TFF-2 ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\varepsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci  $0,03\%$ , respektive  $0,05\%$ ) (viz tab. 90).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci TFF-2 ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=10$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin). Výsledky jsou uvedeny v tab. 91, obr. 26.

### Tabulka 83

TFF-2 –metoda standardního přídávku

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	3,01	-	-
	2,00	4,91	5,01	98,0
	5,00	7,97	8,01	99,5
	10,00	14,04	13,01	108,0
<b>2</b>	-	4,31	-	-
	2,00	6,36	6,31	100,8
	5,00	9,27	9,31	99,5
	10,00	15,58	14,31	108,9
<b>3</b>	-	2,78	-	-
	2,00	4,08	4,78	85,2
	5,00	7,67	7,78	98,6
	10,00	13,44	12,78	105,2
<b>4</b>	-	4,03	-	-
	2,00	5,37	6,03	89,1
	5,00	8,21	9,03	90,9
	10,00	14,42	14,03	102,8

**Tabulka 84**

TFF-2 –test diluční linearity

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	4,59	-	-
	2×	2,07	2,30	90,2
	4×	1,00	1,15	87,4
	8×	0,61	0,57	106,2
<b>2</b>	-	2,51	-	-
	2×	1,21	1,25	96,7
	4×	0,60	0,63	95,7
	8×	0,40	0,31	127,2
<b>3</b>	-	3,60	-	-
	2×	1,61	1,80	89,3
	4×	0,82	0,90	90,7
	8×	0,51	0,45	113,8
<b>4</b>	-	44,04	-	-
	2×	20,51	22,02	93,2
	4×	9,61	11,01	87,3
	8×	5,04	5,50	91,5

**Tabulka 85**TFF-2 – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	26,5	0,3	5,83
<b>2</b>	9,0	0,2	9,00

**Tabulka 86**TFF-2 – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=5$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	23,8	0,89	3,75
<b>2</b>	26,33	0,74	2,79



**Tabulka 87**

TFF-2 – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=16$ )	0,069
SD	0,003
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,078
Mez detekce	0,044 $\mu\text{g/l}$
Mez stanovitelnosti	0,22 $\mu\text{g/l}$

**Tabulka 88**

TFF-2 – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
kočičí	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	nebyla zjištěna
koňské	nebyla zjištěna
opičí	nebyla zjištěna
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
krysí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna

**Tabulka 89**

TFF-2 – vliv rozmrazení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	1x	7,6	6,5	6,0	6,4
	3x	7,5	7,1	6,0	7,3
	5x	7,3	7,1	5,9	7,0
<b>2</b>	1x	5,8	6,4	4,9	6,3
	3x	5,9	5,8	5,0	6,1
	5x	5,8	6,2	4,8	6,1
<b>3</b>	1x	17,3	19,0	13,7	21,1
	3x	17,3	17,2	13,7	20,3
	5x	17,4	18,6	14,6	20,3

**Tabulka 90**

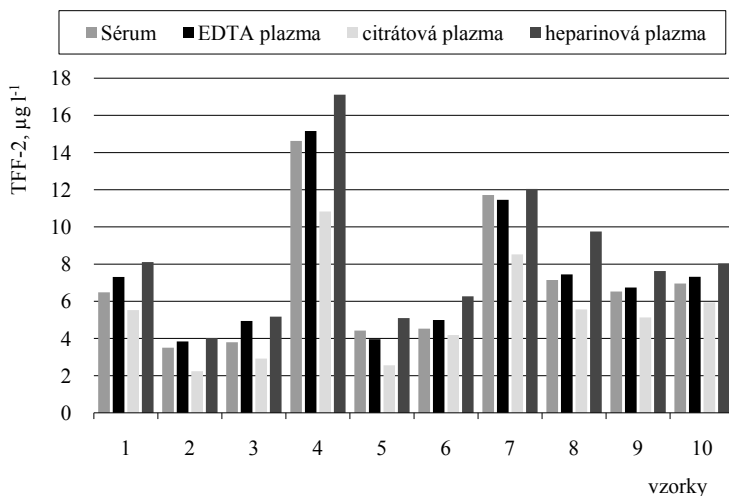
TFF-2 – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	- 80 °C	3,7	4,1	3,2	4,5
	2 – 8 °C, 1 den	3,7	4,0	3,2	4,5
	2 – 8 °C, 7 dní	3,8	3,9	3,2	4,5
<b>2</b>	- 80 °C	10,7	11,4	9,9	13,8
	2 – 8 °C, 1 den	11,6	12,2	10,0	13,1
	2 – 8 °C, 7 dní	11,7	12,1	9,8	13,7
<b>3</b>	- 80 °C	3,4	3,5	2,9	4,0
	2 – 8 °C, 1 den	3,5	3,4	2,9	4,1
	2 – 8 °C, 7 dní	3,6	4,0	3,1	4,3

**Tabulka 91**

TFF-2 – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	6,5	7,3	5,5	8,1
2	3,5	3,8	2,2	4,0
3	3,8	4,9	2,9	5,2
4	14,6	15,2	10,8	17,1
5	4,4	4,0	2,6	5,1
6	4,5	5,0	4,2	6,3
7	11,7	11,5	8,5	12,0
8	7,1	7,5	5,6	9,8
9	6,5	6,7	5,1	7,6
10	7,0	7,3	5,9	8,0
<b>Průměr</b>	<b>7,0</b>	<b>7,3</b>	<b>5,3</b>	<b>8,3</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>104</b>	<b>76</b>	<b>119</b>
<b>R<sup>2</sup></b>		<b>0,98</b>	<b>0,96</b>	<b>0,95</b>

**Obr. 26.** Vliv matrice vzorku na koncentraci TFF-2, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

### 4.1.8.3 TFF-3

#### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace TFF-3 v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace TFF-3. Sérové vzorky od dvou pacientů ( $1,56$  a  $2,11 \mu\text{g l}^{-1}$ ) byly obohaceny o  $+0,3$ ,  $+0,15$  a  $+0,075 \mu\text{g l}^{-1}$  rekombinantního TFF-3 a naředěny  $10\times$  dilučním pufrem a analyzovány. Průměrná hodnota výtěžnosti byla  $102,7 \%$  (tab. 92). V testu linearity byly testovány další čtyři sérové vzorky ( $22,8$  a  $16,24 \mu\text{g l}^{-1}$ ), které byly naředěny  $40\times$  dilučním pufrem a poté dále sériově ředěny  $2\times$ ,  $4\times$  a  $8\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla  $95,0 \%$  (tab. 93).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků měření v sérii ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=6$ ) a vyjádřena jako variační koeficient (tab. 94, tab. 95). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než  $10 \%$ .

Mez detekce metody, představující nejnižší stanovitelnou koncentraci TFF-3, byla  $0,007 \mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace TFF-3, odpovídající absorpanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorpance slepého vzorku ( $n=16$ ) +  $3\times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky TFF-3). Mezstanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla  $0,035 \mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 96).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze králíčího, kozího, ovčího, prasečího, koňského, křeččího, kočičího, hovězího a krysího vzorku séra. Výsledky testů tak ukazují na jeho specifitu pro lidský TFF-3 (tab. 97).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení TFF-3 byl posuzován efekt rozmrazení/zamražení ( $5\times$ ) a stabilita vzorků při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nebyl zjištěn vliv zamrazení/rozmrazení ( $5\times$ ) na koncentraci TFF-3 ve vzorcích (tab. 98). Pokud byly vzorky skladovány při teplotě  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci TFF-3 ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci  $0,03\%$ , respektive  $0,05\%$ ) (viz tab. 99).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci TFF-3 ve vzorku bylo porovnáno deset vzorků séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin). Výsledky jsou uvedeny v tab. 100, obr. 27.

**Tabulka 92**

TFF-3 –metoda standardního přídatku

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	1,560	-	-
	0,300	4,780	4,560	104,8
	0,150	3,100	3,060	101,3
	0,075	2,250	2,310	97,4
<b>2</b>	-	2,110	-	-
	0,300	5,290	2,110	103,5
	0,150	3,710	3,610	102,8
	0,075	3,400	2,860	106,3

**Tabulka 93**

TFF-3 –test diluční linearity

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	22,08	-	-
	2×	10,28	11,04	93,1
	4×	5,56	5,52	100,7
	8×	2,52	2,76	91,3
<b>2</b>	-	16,24	-	-
	2×	8,24	8,12	101,5
	4×	3,52	4,06	86,7
	8×	1,96	2,03	96,6

**Tabulka 94**TFF-3 – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	1,18	0,7	5,6
<b>2</b>	7,11	0,54	7,6

**Tabulka 95**TFF-3 – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=6$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
1	1,57	0,1	6,4
2	8,77	0,66	7,5

**Tabulka 96**

TFF-3 – výpočet meze detekce a mezestanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=16$ )	0,0239
SD	0,0034
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,034
Mez detekce	0,007 $\mu\text{g/l}$
Mez stanovitelnosti	0,035 $\mu\text{g/l}$

**Tabulka 97**

TFF-3 – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
kočičí	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	nebyla zjištěna
koňské	nebyla zjištěna
opičí	nebyla zjištěna
myší	nebyla zjištěna
prasečí	nebyla zjištěna
králičí	nebyla zjištěna
krysí	nebyla zjištěna
ovčí	nebyla zjištěna

**Tabulka 98**

TFF-3 – vliv rozmrazení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	1x	1,12	1,17	0,77	1,25
	3x	1,10	1,17	0,78	1,32
	5x	1,00	1,19	0,94	1,16
<b>2</b>	1x	1,18	1,27	0,97	1,20
	3x	1,26	1,33	0,93	1,23
	5x	1,29	1,20	0,95	1,44
<b>3</b>	1x	0,90	1,10	0,81	1,16
	3x	1,18	1,18	0,88	1,22
	5x	0,94	1,14	0,86	1,24

**Tabulka 99**

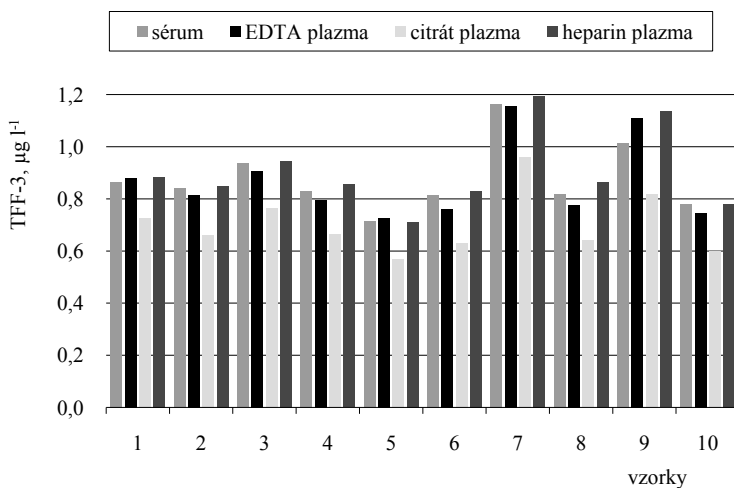
TFF-3 – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	- 80 °C	1,04	0,98	0,79	1,00
	2 – 8 °C, 1 den	0,91	0,96	0,75	0,98
	2 – 8 °C, 7 dní	1,05	0,98	0,82	1,00
<b>2</b>	- 80 °C	0,98	0,96	0,74	0,97
	2 – 8 °C, 1 den	1,04	1,00	0,85	1,12
	2 – 8 °C, 7 dní	1,03	1,14	0,90	1,14
<b>3</b>	- 80 °C	1,70	1,63	1,41	1,73
	2 – 8 °C, 1 den	1,54	1,64	1,35	1,74
	2 – 8 °C, 7 dní	1,66	1,71	1,38	1,73

**Tabulka 100**

TFF-3 – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	0,87	0,88	0,73	0,89
2	0,84	0,82	0,66	0,85
3	0,94	0,91	0,77	0,95
4	0,83	0,80	0,67	0,86
5	0,72	0,73	0,57	0,71
6	0,82	0,76	0,63	0,83
7	1,17	1,16	0,96	1,20
8	0,82	0,78	0,64	0,87
9	1,02	1,11	0,82	1,14
10	0,78	0,75	0,60	0,78
<b>Průměr</b>	<b>0,88</b>	<b>0,87</b>	<b>0,70</b>	<b>0,91</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>99</b>	<b>80</b>	<b>103</b>

**Obr. 27.** Vliv matrice vzorku na koncentraci TFF-2, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně



## 4.1.9 S100A-11

### Analytická charakteristika ELISA metody

Pro ověření analytických charakteristik stanovení koncentrace S100A-11 v séru pomocí nové ELISA soupravy byla testována také preciznost a vychýlení metody. Vychýlení metody bylo ověřeno metodou standardního přídatku a byla zjišťována výtěžnost, vyjádřená jako poměr získané/očekávané hodnoty koncentrace S100A-11. Sérové vzorky od dvou pacientů (6,24 a 14,96  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) byly obohaceny o +3, +6 a +12  $\mu\text{g l}^{-1}$  S100A-11. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 99 % (tab. 101). V testu linearit byly testovány další dva sérové vzorky (2,74 a 11,08  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), které byly sériově ředěny 2 $\times$ , 4 $\times$  a 8 $\times$ , přičemž průměrná hodnota výtěžku byla 94 % (tab. 102).

Preciznost metody byla testována jako opakovatelnost výsledků měření v sérii ( $n=8$ ) a jako mezilehlá preciznost výsledků mezi sériemi měření ( $n=10$ ) a vyjádřena jako variační koeficient (tab. 103, tab. 104). Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 12 %.

Mez detekce metody, představující nejnížší stanovitelnou koncentraci S100A-11, byla 0,007  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tato hodnota je vyjádřením koncentrace S100A-11, odpovídající absorbanci vypočítané podle vzorce: průměrná hodnota absorbance slepého vzorku ( $n=16$ ) + 3 $\times$  směrodatná odchylka průměru slepého vzorku, a byla odečtena z kalibrační křivky S100A-11). Mez stanovitelnosti (vypočítaná jako součin meze detekce a dilučního faktoru) byla 0,021  $\mu\text{g l}^{-1}$  (tab. 105).

V ELISA testu nebyla zjištěna žádná křížová reaktivita při analýze hovězího, kočičího, kozího, koňského, myšího, ovčího a psího vzorku séra. Byla zjištěna křížová reaktivita u křeččího, opičího, prasečího, králíčího a krysího vzorku séra (tab. 106).

V rámci testování stability vzorků pro stanovení S100A-11 byl posuzován efekt rozmrazení/zamražení (5 $\times$ ) a stabilita vzorků při teplotě 4 °C. Nebyl zjištěn vliv zamražení/rozmražení (5 $\times$ ) na koncentraci S100A-11 ve vzorcích (tab. 107). Pokud byly vzorky skladovány při teplotě 2-8 °C po dobu sedmi dnů, nebyl zjištěn pokles v koncentraci S100A-11 ve vzorcích (na potlačení bakteriální kontaminace byla ke vzorkům přidána kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová a thimerosal ve výsledné koncentraci 0,03%, respektive 0,05%) (viz tab. 108).

Ke zjištění vlivu matrice (typu vzorku) na koncentraci S100A-11 ve vzorku byly porovnány vzorky ( $n=10$ ) séra a plazmy (EDTA, citrát a heparin). Na základě výpočtů poměru plazma/sérum bylo doporučeno používat jako materiál pro stanovení S100A-11 ELISA pouze sérum. Výsledky jsou uvedeny v tab. 109, obr. 28.

**Tabulka 101**

S100A-11 –metoda standardního přidavku

Vzorek	Přídavek	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	6,24	-	-
	3,0	9,63	9,24	104,3
	6,0	12,49	12,24	102,1
	12,0	17,16	18,24	94,1
<b>2</b>	-	14,96	-	-
	3,0	18,13	17,96	100,9
	6,0	20,37	20,96	97,2
	12,0	25,47	26,96	94,4

**Tabulka 102**

S100A-11 –test diluční linearity

Vzorek	Ředění	Změřeno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Očekáváno ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výtěžek Z/O (%)
<b>1</b>	-	2,74	-	-
	2x	1,26	1,37	92,2
	4x	0,68	0,68	98,6
	8x	0,34	0,34	99,0
<b>2</b>	-	11,08	-	-
	2x	5,19	5,54	93,7
	4x	2,51	2,77	90,4
	8x	1,28	1,39	92,0

**Tabulka 103**S100A-11 – ověření opakovatelnosti výsledků v sérii měření ( $n=8$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
<b>1</b>	2,6	0,05	2,1
<b>2</b>	10,96	0,2	1,9

**Tabulka 104**S100A-11 – ověření mezilehlé preciznosti výsledků mezi sériemi měření ( $n=10$ )

Vzorek	Průměr ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	SD	CV (%)
1	2,63	0,31	11,7
2	10,83	0,97	9,0

**Tabulka 105**

S100A-11 – výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti

Průměr absorbance slepého vzorku ( $n=16$ )	0,008
SD	0,00091
$\Phi$ absorbance blanku + $3 \times$ SD	0,0104
Mez detekce	0,007 $\mu\text{g/l}$
Mez stanovitelnosti	0,021 $\mu\text{g/l}$

**Tabulka 106**

S100A-11 – test křížové reaktivity různých živočišných sér

Vzorek séra	Křížová reaktivita
hovězí	nebyla zjištěna
kočičí	nebyla zjištěna
kozí	nebyla zjištěna
křeččí	<b>byla zjištěna</b>
koňské	nebyla zjištěna
opičí	<b>byla zjištěna</b>
myší	nebyla zjištěna
prasečí	<b>byla zjištěna</b>
králičí	<b>byla zjištěna</b>
krysí	<b>byla zjištěna</b>
ovčí	nebyla zjištěna

**Tabulka 107**

S100A-11 – vliv rozmrazení/zamražení na stabilitu vzorku

Vzorek	Počet cyklů rozmražení/zamražení	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	1x	14,42	13,08	11,32	20,32
	3x	17,54	14,40	13,24	22,30
	5x	16,97	12,57	12,47	19,96
<b>2</b>	1x	4,71	2,08	3,37	9,66
	3x	5,26	2,49	3,97	10,25
	5x	4,49	2,21	3,52	8,11
<b>3</b>	1x	3,02	1,94	5,48	4,43
	3x	3,29	2,16	5,72	4,70
	5x	3,07	1,98	5,87	4,43

**Tabulka 108**

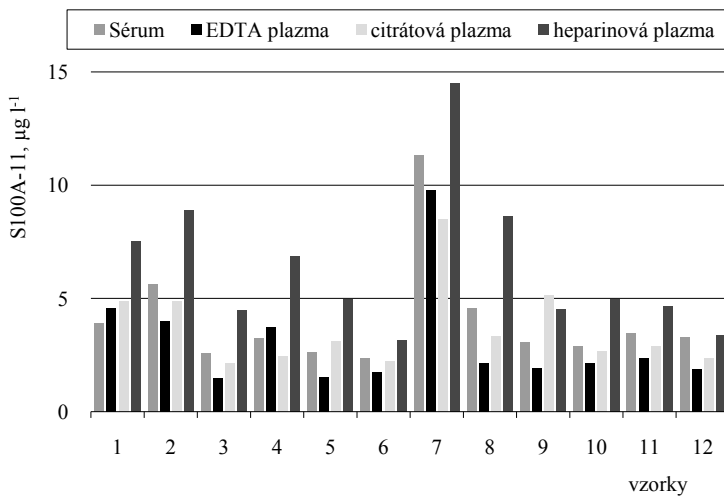
S100A-11 – vliv teploty a délky skladování na stabilitu vzorku

Vzorek	Teplota a délka skladování	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
			EDTA	Citrát	Heparin
<b>1</b>	- 80 °C	2,98	1,80	2,38	4,72
	2 – 8 °C, 1 den	2,84	1,79	2,36	4,74
	2 – 8 °C, 7 dní	3,01	1,86	2,32	4,81
<b>2</b>	- 80 °C	6,15	4,13	5,58	18,76
	2 – 8 °C, 1 den	5,82	3,87	5,54	18,44
	2 – 8 °C, 7 dní	6,03	4,13	5,54	19,33
<b>3</b>	- 80 °C	3,55	4,01	2,74	7,77
	2 – 8 °C, 1 den	3,57	4,03	2,80	7,78
	2 – 8 °C, 7 dní	3,66	4,09	2,66	8,20

**Tabulka 109**

S100A-11 – vliv matrice vzorku

Vzorek	Sérum ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Plazma ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
		EDTA	Citrát	Heparin
1	3,93	4,56	4,89	7,53
2	5,63	3,98	4,86	8,88
3	2,59	1,47	2,12	4,48
4	3,25	3,71	2,46	6,85
5	2,62	1,51	3,12	4,96
6	2,35	1,75	2,22	3,17
7	11,34	9,78	8,49	14,51
8	4,56	2,13	3,32	8,62
9	3,07	1,91	5,14	4,51
10	2,91	2,14	2,66	4,98
<b>Průměr</b>	<b>4,23</b>	<b>3,29</b>	<b>3,82</b>	<b>6,85</b>
<b>Průměr plazma/sérum (%)</b>		<b>77,8</b>	<b>90,3</b>	<b>161,9</b>
<b>R<sup>2</sup></b>		<b>0,88</b>	<b>0,77</b>	<b>0,87</b>

**Obr. 28.** Vliv matrice vzorku na koncentraci TFF-2, sloupcový graf; jednotlivé matrice jsou odlišeny barevně

## 4.2 Ověření hypotéz a výsledků experimentálních studií v klinických pilotních studiích

### 4.2.1 Osteokrin

#### Klinické testování výsledků získaných stanovením ELISA (1)

U sledovaných osob nebyly zjištěny žádné souvislosti mezi hodnotami koncentrace osteokrinu v séru a ostatními měřeními ukazateli. Hodnoty osteokrinu v séru se nelišily ani podle pohlaví, podle výskytu rezistence k inzulinu ani výskytu dyslipidémie (tab. 110).

**Tabulka 110**

Hodnoty osteokrinu u sledovaných skupin

Sledovaný parametr <sup>b</sup>	Průměr	Medián	Signifikace <sup>a</sup>
Muži	1,8	1,2	
Ženy	8,1	1,6	NS, p=0,56
Inzulinová rezistence ANO	2,1	1,4	
Inzulinová rezistence NE	5,2	1,6	NS, p=0,6
Dyslipidémie ANO	2	1,5	
Dyslipidémie NE	8,4	1,4	NS, p=0,4

<sup>a</sup> NS – nesignifikantní, *p*-hladina významnosti, <sup>b</sup> definice rezistence k inzulinu – na základě hodnoty *Quicki* (jedinci s hodnotou pod 0,357 byli definováni jako osoby s rezistencí k inzulinu), definice dyslipidémie – do skupiny osob s dyslipidémií byli zařazeni jedinci s minimálně dvěma znaky ze tří (zvýšena hodnota TAG, celkového cholesterolu nebo snížena hodnota HDL cholesterolu), Do skupiny jedinců bez dyslipidémie byli zařazeni pouze jedinci s normální hodnotou celkového cholesterolu, HDL cholesterolu a TAG.

### 4.2.2 PEDF

#### Klinické testování výsledků získaných stanovením ELISA (2)

Výsledky měření u osob s metabolickým syndromem vykazovaly abnormální rozložení dat, v rozmezí od 4,7 mg l<sup>-1</sup> do 32,5 mg l<sup>-1</sup>, s mediánem 23,2 mg l<sup>-1</sup>. Koncentrace PEDF v séru se nelišila mezi muži a ženami (tab. 111).

Analýzou dat bylo zjištěno, že koncentrace PEDF v séru koreluje s BMI ( $r=0,32$ ,  $p<0,01$ ), CRP ( $r=0,33$ ,  $p<0,01$ ) a inzulinem ( $r=0,082$ ,  $p<0,05$ ). Jedinci

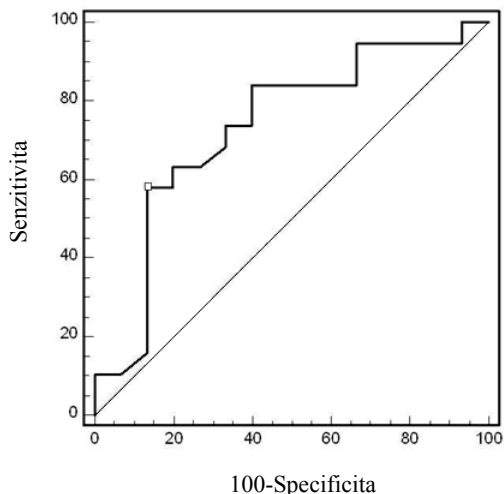
s metabolickým syndromem (n=72) měli signifikantně zvýšenou koncentraci PEDF v séru oproti zdravým jedincům bez metabolického syndromu (bez přítomnosti složek metabolického syndromu, n=40), (medián 15,6 mg l<sup>-1</sup> a 11,2 mg l<sup>-1</sup>, p<0,01).

Senzitivita a specifčnost stanovení koncentrace PEDF v séru pro diagnostiku přítomnosti MetSy byla 57,9 %, respektive 86,7 % při zvolené cut-off hodnotě 14,9 mg l<sup>-1</sup> (plocha pod operační křivkou ROC 0,75; 95 % interval spolehlivosti 0,55-0,87; LR +4,34), (obr. 29).

### Tabulka 111

Laboratorní charakteristika zvoleného souboru osob s přítomností nebo bez přítomnosti metabolického syndromu

Parametr	Jednotka	Průměr	SD	Medián
PEDF (celkem)	mg l <sup>-1</sup>	16,4	8,2	13,2
PEDF (muži)	mg l <sup>-1</sup>	15,9	7,4	13,9
PEDF (ženy)	mg l <sup>-1</sup>	16,7	9,1	13,0
BMI	kg m <sup>-2</sup>	31,1	4,7	29,8
CRP	mg l <sup>-1</sup>	5,7	2,1	4,0
Inzulin	IU l <sup>-1</sup>	16,7	5,7	16,9
Glukóza	mmol l <sup>-1</sup>	6,1	3,2	6,3



**Obr. 29.** ROC analýza pro stanovení PEDF v séru u osob s metabolickým syndromem

Multivariační analýzou bylo zjištěno, že žádný z měřených parametrů nebyl významně nezávislým ukazatelem určujícím koncentraci PEDF v séru. Po adjustaci koncentrace PEDF v séru na BMI byla koncentrace PEDF významně vyšší u osob s přítomností složek metabolického syndromu než u zdravých osob. Zjistili jsme významnou korelaci mezi koncentrací PEDF v séru a počtem složek (kritérii) metabolického syndromu a tento vztah byl potvrzen provedením frekvenční analýzy ( $\chi^2=62,1$ ;  $p<0,01$ ).

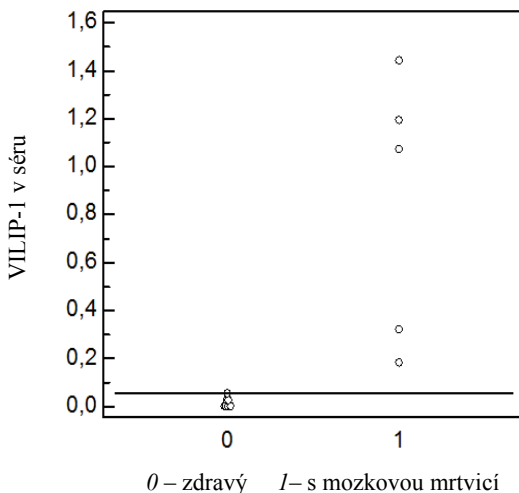
### 4.2.3 VILIP-1

#### Klinické testování výsledků získaných stanovením ELISA (3,4,10)

##### I. STUDIE (3)

Při klinickém testování stanovení koncentrace VILIP-1v séru i likvoru bylo zjištěno, že osoby s ischemickou cévní mozkovou příhodou (CMP) měly vyšší hodnoty VILIP-1 než osoby bez neurologického postižení CNS (všichni jedinci s CMP měli hodnoty VILIP-1  $> 0,05 \mu\text{g l}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ), jedinci bez postižení CNS měli hodnoty  $< 0,05 \mu\text{g l}^{-1}$  (senzitivita 85,7%; specifičnost 100%; obr. 30).





**Obr. 30.** Interaktivní bodový diagram v rámci operační křivky pro stanovení VILIP-1u osob s ischemickou CMP

## II. STUDIE (4)

V další klinické studii, která zahrnovala celkem 33 jedinců, ze kterých bylo 17 zdravých (kontrolní skupina) a 16 s CMP, nebyl nalezen signifikantní rozdíl v koncentraci VILIP-1 v séru nebo likvoru u zdravých osob (koncentrace VILIP-1 v séru muži/ženy: 0,03/0,02 µg l<sup>-1</sup>, p=0,8; koncentrace VILIP-1 v likvoru muži/ženy: 0,08/0,06 µg l<sup>-1</sup>, p=0,55) ani ve skupině osob s mozkovou mrtvicí (koncentrace VILIP-1 v séru muži/ženy: 0,64/2,5 µg l<sup>-1</sup>, p=0,35; koncentrace VILIP-1 v likvoru muži/ženy: 0,23/0,12 µg l<sup>-1</sup>, p=0,07).

Byly nalezeny signifikantní rozdíly v koncentraci VILIP-1 v séru i likvoru mezi skupinou zdravých a skupinou s mozkovou mrtvicí: v séru 0,03/ 1,78 µg l<sup>-1</sup>, p < 0,01 a v likvoru 0,07/0,16 µg l<sup>-1</sup>, p < 0,01; (tab. 112, obr. 31). Senzitivita i specifčnost stanovení koncentrace VILIP-1 v séru pro klinickou diagnostiku mozkové mrtvice byla 100%.

Sérové hladiny VILIP-1 souvisely s koncentrací ApoA-I (r= -0,23, p=0,02), s indexem ApoA-I likvor/sérum (r= -0,23, p=0,04) a koncentrací VILIP-1 v likvoru (r=0,4;p<0,01).

**Tabulka 112**

Porovnání výsledků měření mezi skupinou zdravých pacientů (0) a s mozkovou mrtvicí (1)

Vyšetření	0			Diference	1		
	Průměr	SD	Medián		Průměr	SD	Medián
CSF_ALB	446,4	368,6	355,9	p=0,08, NS	286,8	150,1	232,6
CSF_APOA	5,9	3	5,1	p=0,20, NS	5,2	3,7	4
CSF_ApoB	1,6	0,4	1,5	p=0,23, NS	1,8	1,6	1,5
CSF_BAM	795,6	225,4	799,7	p=0,18, NS	876,7	277,7	893,5
CSF_CLUS	7008,4	3921,6	6151	p=0,71, NS	6430,5	2238,1	7297,5
CSF_CRP	129,8	309,6	14,7	p=0,95, NS	88,4	222,9	18,3
CSF_CysC	5,2	0,8	5,1	p=0,71, NS	5,5	2,1	5,7
CSF_FIBR	4,4	0,9	4,1	p=0,93, NS	4,3	0,5	4,4
CSF_Hap	4,5	8,3	2,4	p=0,06, NS	2	2,4	0,9
CSF_IGA	5,4	3,5	4,7	p=0,51, NS	6,1	3,3	6,4
CSF_IGG	46,4	24,7	39,5	p=0,39, NS	53,6	23,2	63,8
CSF_IGM	2,1	5	0,6	p=0,95, NS	0,8	0,6	0,6
CSF ORM	10,5	7	8,7	p=0,24, NS	8,5	6,2	6,9
CSF_PREA	18,6	2	18,1	p=0,58, NS	18,9	2,1	18,5
CSF_TAU	240,3	85,5	231	p=0,15, NS	399,3	382,4	282
S_ALB	42,7	4,9	43	p=0,09, NS	39,9	5,6	40
S_APOA	1,2	0,2	1,2	p=0,30, NS	1,1	0,3	1,1
S_APOB	1	0,3	1	p=0,89, NS	1	0,3	1
S_CLUS	6954,5	2148,2	6897,4	p=0,49, NS	7123,5	2432	7011,9
S_CRP	34,7	73,9	4,3	p=0,29, NS	12,5	19,1	5,4
S_CYST	0,9	0,2	0,9	p=0,15, NS	1,1	0,2	1
S_Hap	1,8	1,2	1,6	p=0,15, NS	1,3	0,5	1,3
S_IGA	2,1	0,7	2	p=0,10, NS	3	1,2	2,8
S_IGG	8,9	2,8	8,2	p=0,30, NS	11,4	4,7	11,8
S_IGM	1,1	0,5	1	p=0,61, NS	1,3	1	0,9
S_PREA	0,3	0,1	0,3	p=0,78, NS	0,3	0,1	0,3
S ORM	1,1	0,4	1	p=0,18, NS	0,9	0,3	0,9
S_VILIP-1	0,03	0,03	0,02	<b>p&lt;0,01, VS</b>	1,8	3,6	0,8
Ind_PREA	81,6	40,1	67,6	p=0,69, NS	82,7	38,2	68,5
Ind_ALB	10,6	8,6	7,8	p=0,13, NS	7,5	5	6
Ind_ApoA	5,1	2,6	4,6	p=0,24, NS	5	4,6	3,6
Ind_ApoB	1,7	0,6	1,5	p=0,91, NS	2,2	2,6	1,5
Ind_CLUS	0,9	0,2	0,9	p=0,84, NS	0,9	0,6	0,8
Ind_CRP	6,9	6,4	4,7	p=0,73, NS	9,1	8,9	4
Ind_CYST	5,7	1,7	5,8	p=0,57, NS	5,1	2	5,3
Ind_HP	1,9	1,8	1,3	p=0,90, NS	2	3,7	0,9
Ind_IGA	2,5	1,5	2,1	p=0,81, NS	2,1	1,1	2
Ind_IGG	5,7	3,6	4,8	p=0,76, NS	4,9	2,6	4,8
Ind_PREA	81,6	40,1	67,6	p=0,69, NS	82,7	38,2	68,5
Ind ORM	9,5	4,4	8	p=0,72, NS	9,1	5,2	8,2
Ind_VILIP-1	4,73	6,5	2,6	<b>p&lt;0,01, VS</b>	0,2	0,27	0,07
Csf_VILIP-1	0,07	0,05	0,07	<b>p&lt;0,01, VS</b>	0,16	0,15	0,1

CSF<sub>x</sub> = měřeno v likvoru; S<sub>x</sub> = měřeno v séru; SD=směrodatná odchylka; ALB=albumin;

APOA=ApoAI; ApoB=ApoB; BAM=beta amyloid; TAU=tau-protein; CLUS=clusterin; CRP=C-reaktivní protein; CysC/CYST=cystatin C; Fibr=fibrinogen; Hap=haptoglobin;

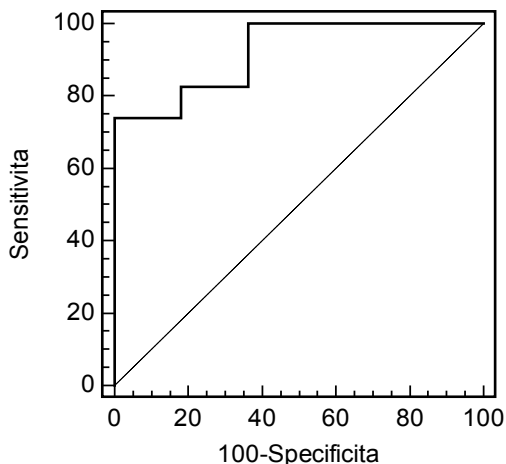
IGA=imunoglobulin A; IGG=imunoglobulin G; IGM=imunoglobulin M; ORM=orosomukoid;

PREA=prealbumin; VILIP-1=Visinin like protein I, p=hladina významnosti, NS=nesignifikantní,

VS=signifikantní, Ind=poměr CSF/S



rozdílů přetrvávala i po adjustaci na pohlaví, věk a další sledované parametry. Efektivita testu pro klinické účely byla uspokojivá (plocha pod operační křivkou ROC 0,92; 95% interval spolehlivosti 0,78-0,99; senzitivita 78%, specifická 100 %, pozitivní prediktivní hodnota 100% při hodnotě Dkk-1 > 3,86  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) (obr. 32).



**Obr. 32.** ROC analýza pro stanovení Dkk-1 v séru u pacientů s osteoporózou

**Tabulka 113**

Hodnoty Dkk-1 v  $\mu\text{g l}^{-1}$  u sledovaných pacientů dle přítomnosti osteoporózy

Stav	x	Medián	SD	Normalita	<i>p</i>
Osteoporóza	4,79	5,02	1,1	Ano	< 0,01
Normální kostní densita	2,79	2,61	0,75	Ano	-

## 4.2.6 Chemerin

### Klinické testování výsledků získaných stanovením ELISA(9,14)

Ve skupině zdravých jedinců ( $n=50$ , 26 mužů a 24 žen) nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentraci chemerinu v séru mezi muži a ženami (tab. 114).

### Tabulka 114

Koncentrace chemerinu v séru v  $\mu\text{g l}^{-1}$  zdravých jedinců v závislosti na pohlaví

Parametr	chemerin (průměr)	chemerin (medián)	SD	<i>P</i>
ženy + muži	186	192,5	25,7	-
ženy	196,7	209	28,3	-
muži	171,2	167	11,9	0,09

Ve skupině jedinců s vysokým rizikem MetSy byla zjištěna významně zvýšená koncentrace chemerinu v séru v porovnání s jedinci bez přítomnosti MetSy nebo zdravými jedinci (nenormální rozložení dat; medián 266, 230, 192,5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p < 0,01$ ) (tab.115).

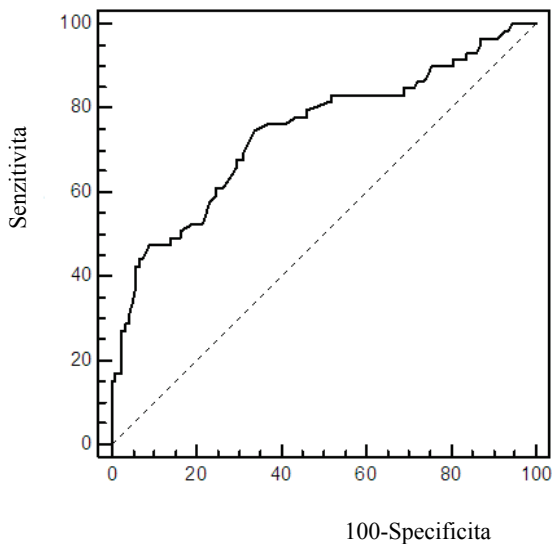
Při hledání souvislostí mezi měřenými ukazateli byly nalezeny významné korelace mezi koncentrací chemerinu v séru a věkem probandů ( $r=0,23$ ;  $p<0,01$ ), chemerinem a glukózou ( $r=0,23$ ;  $p<0,01$ ), chemerinem a HDL cholesterolem ( $r= -0,19$ ;  $p<0,01$ ), chemerinem a triacylglyceroly ( $r=0,22$ ;  $p<0,01$ ), chemerinem a systolickým/diastolickým krevním tlakem ( $r=0,40$ ,  $p<0,01$ ;  $r=0,24$ ,  $p<0,01$ ).

**Tabulka 115**

Biochemické parametry u jedinců s MetSy ( $n=59$ ) a bez přítomnosti MetSy ( $n=122$ )  
(data v tabulce jsou uvedeny jako *medián (průměr + SD)*)

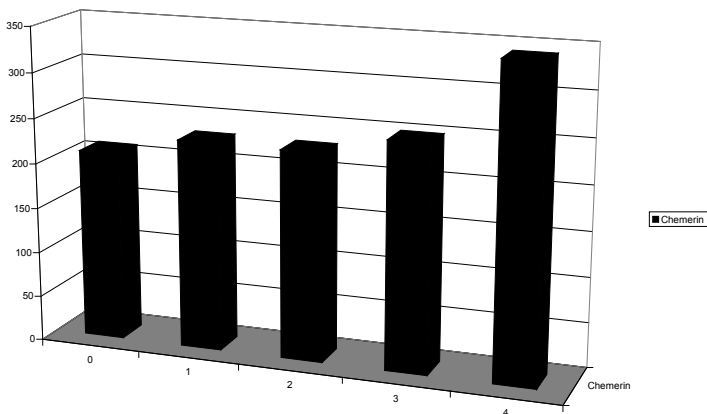
Parametr	pacienti s MetSy	pacienti bez MetSy	hladina významnosti $P$
Adiponektin (mg l <sup>-1</sup> )	10,80 (11,80+7,20)	10,0 (12,80+7,50)	0,71
Věk (roky)	62,0 (62,40+11,90)	64,0 (63,50+12,20)	0,57
ALT (μkat l <sup>-1</sup> )	0,48 (0,55+0,30)	0,48 (0,61+0,72)	0,85
AST (μkat l <sup>-1</sup> )	0,50 (0,55+0,22)	0,49 (0,62+0,7)	0,96
BMI (kg m <sup>-2</sup> )	31,20 (30,60+4,60)	27,10 (28,0+4,42)	< 0,01
CK (μkat l <sup>-1</sup> )	1,60 (2,35+2,37)	1,93 (2,28+1,40)	0,09
Glukóza (mmol l <sup>-1</sup> )	8,40 (9,05+23,89)	5,55 (6,26+2,50)	< 0,01
HDL (mmol l <sup>-1</sup> )	1,16 (1,20+0,30)	1,49 (1,53+0,37)	< 0,01
HOMA (-)	3,97 (4,27+2,64)	4,1(4,39+2,78)	0,94
Chemerin (μg l <sup>-1</sup> )	266,0 (285,0+80,70)	230 (228,90+41,10)	< 0,01
Cholesterol (mmol l <sup>-1</sup> )	4,90 (8,20+4,22)	5,2 (8,60+4,9)	0,13
Insulin (kIU l <sup>-1</sup> )	10,60 (10,93+6,97)	10,5 (12,47+8,2)	0,6
Kys močová (μmol l <sup>-1</sup> )	354,0 (358,0+101,7)	319,5 (321,3+73,5)	< 0,01
LDL (mmol l <sup>-1</sup> )	2,71 (2,83+0,74)	2,86 (2,96+0,77)	0,27
Quicki (-)	0,51 (0,56+0,18)	0,53 (0,63+0,22)	0,2
TK-diaistol (Hg/mm)	80,0 (83,1+4,73)	80,0 (80,74+3,7)	< 0,01
TK-systol(Hg/mm)	135,0 (136,0+6,94)	130,0(131,0+3,90)	< 0,01
TAG (mmol l <sup>-1</sup> )	2,06 (2,24+0,98)	1,38 (1,61+0,84)	< 0,01
obvod pasu (cm)	101,0 (98,86+10,8)	90,0 (92,80+15,10)	< 0,01

ROC analýzou byla určena diagnostická efektivita stanovení chemerinu v séru pro diagnostiku přítomnosti MetSy. Bylo zjištěno, že při hodnotě cut-off chemerinu  $240 \mu\text{g l}^{-1}$  má stanovení senzitivitu 75 % a specificku 67 % (plocha pod operační křivkou ROC 0,75; 95 % interval spolehlivosti 0,68-0,81; LR +2,22) (obr. 27). Současně bylo porovnáním ROC zjištěno, že stanovení chemerinu má pro diagnózu MetSy vyšší diagnostickou efektivitu než stanovení adiponektinu ( $p < 0,01$ ).



**Obr. 33.** ROC analýza pro stanovení chemerinu v séru u osob s metabolickým syndromem

Dále byla u pacientů s MetSy provedena stratifikace koncentrace chemerinu v séru podle jednotlivých komponent přítomných u MetSy (0, 1, 2, 3 a více než 4). Koncentrace chemerinu je uvedena jako medián (průměr + SD): 0 = 210,0 (193,1 + 40,1)  $\mu\text{g l}^{-1}$ ; 1 = 231,0 (224,9 + 45,5)  $\mu\text{g l}^{-1}$ ; 2 = 230,0 (235,7 + 35,9)  $\mu\text{g l}^{-1}$ ; 3 = 249,5 (251,6 + 47,2)  $\mu\text{g l}^{-1}$ ; 4 = 341,5 (388,5 + 122,2)  $\mu\text{g l}^{-1}$  (obr. 28).



**Obr. 34.** Koncentrace chemerinu v séru v  $\mu\text{g l}^{-1}$  stratifikované podle počtu komponent metabolického syndromu

Byla nalezena významná pozitivní souvislost mezi koncentrací chemerinu v séru a počtem kritérií pro diagnostiku metabolického syndromu a tato shoda byla potvrzena provedením chí kvadrát testu ( $\chi^2 = 66,5$ ,  $p < 0,01$ , data nejsou uvedena).

#### 4.2.7 PSP-94

##### **Klinické testování výsledků získaných stanovením ELISA(15)**

Při klinickém testování stanovení koncentrace PSP-94 v séru bylo vyšetřeno celkem 121 mužů, u kterých byl stanoven PSP-94, PSA, volný PSA v séru a zároveň byla odebrána anamnéza a provedeno sonografické vyšetření prostaty. Vyhodnocením dat bylo zjištěno, že 49 osob nemělo žádné onemocnění prostaty, 27 mělo chronický zánět prostaty a 45 bylo aktuálně po radikální prostatektomii (RAPPE) pro karcinom prostaty. Hodnoty PSP-94 v séru souvisely s koncentrací PSA a volného PSA v séru ( $r \geq 0,41$ ,  $p < 0,01$ ). Osoby po RAPPE měly nejnižší hodnoty PSA, nicméně v hodnotách PSP-94 se testování pacienti významně nelišili (16 vs, 20 vs, 11,8  $\mu\text{g l}^{-1}$ ; zdraví, prostatitis, stp RAPPE), i když jedinci po RAPPE měli hodnoty nejnižší. Souvislost mezi Gleasonským skóre a koncentrací PSP-94 v séru se nepodařilo prokázat.



## 4.2.8 TFF

### Klinické testování výsledků získaných stanovením ELISA(16,24)

Do studie bylo zahrnuto celkem 44 žen, z nichž 30 bylo bez karcinomu endometria a 14 žen s diagnózou karcinomu endometria.

Bylo zjištěno, že ženy s karcinomem měly významně zvýšené sérové hodnoty TFF-3 (TFF-3: 2,7 vs. 1,0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ).

Ve skupině žen s karcinomem endometria nebyl zjištěn významný rozdíl v koncentracích Ca-125, TFF-1, TFF-2 a AIF-1.

## 4.2.9 S100A-11

### Klinické testování výsledků získaných stanovením ELISA(24)

Do studie bylo, stejně jako v předchozím pilotním projektu, zahrnuto celkem 44 žen, z nichž 30 bylo bez karcinomu endometria a 14 žen s diagnózou karcinomu endometria. Bylo zjištěno, že ženy s karcinomem měly významně zvýšené sérové hodnoty S100A-11 (S100A-11: 7,2 vs. 4,2  $\mu\text{g l}^{-1}$ ,  $p < 0,01$ ).

Ve skupině žen s karcinomem endometria nebyl zjištěn významný rozdíl v koncentracích Ca-125, TFF-1, TFF-2 a AIF-1.

Na základě výsledků regresní analýzy (data nejsou uvedena) bylo, jako ukazatel první volby při diagnostice karcinomu endometria, doporučeno využít ze všech parametrů pouze stanovení sérové koncentrace S100A-11.

## 5. Diskuse

V dnešní době je dostupná řada metod pro analýzu proteinů (antigenů, protilátek). Patří zde například metody s isotopovou (radioaktivní), enzymatickou, fluorescenční, luminiscenční detekcí nebo jejich modifikace.

Z našeho pohledu a vzhledem k předpokládanému účelu jsme vyvinuli metodu založenou na enzymatické detekci. ELISA patří mezi heterogenní analýzy s nutností separace nenávané frakce od vázané. V našem případě jsme zvolili ELISA metodu v sendvičovém uspořádání s imobilizovanou primární protilátkou, sekundární protilátkou značenou biotinem a enzymem konjugovaným se streptavidinem. Velkou výhodou této techniky je, že nemusí být k dispozici značený čistý antigen. Další výhodou je vysoká citlivost a snadná optimalizace, neboť pevná fáze se protilátkou nasytí a nemusí se stanovovat její optimální koncentrace. V neposlední řadě je vývoj ELISA z pohledu součtu provozních a investičních nákladů výhodná i pro relativně malé firmy. RIA metody omezuje jednak nutnost zacházení s radioaktivním materiálem a také v porovnání s ELISA nedosahují dostatečné citlivosti a tím i kvantifikovatelnosti měření. Z finančního hlediska bylo nevhodné pro vývoj používat metody založené na detekci fluorescence (např. MEIA), vzhledem k vysoké ceně pořízení licenčního povolení (Luminex). V rámci klinického výzkumu mají velký potenciál i metody založené na biočipové technologii nebo multiplexová analýza. Jde o relativně nové metody, které nacházejí své uplatnění zejména v klinickém výzkumu např. pro analýzy onkologických, kardiologických, endokrinologických, kostních, serologických, metabolických a toxikologických markerů, cytokinů, růstových faktorů a dalších. V porovnání s ELISA metodami patří mezi největší výhody těchto technologií zejména možnost stanovení velkého počtu analytů současně, a tedy se stejnou preanalytickou fází, z malého objemu vzorku. Možnost získání velkého množství dat z jedné analýzy, může být výhodné při hledání ideálních biomarkerů, respektive jejich kombinací, například v oblasti onkologického výzkumu. Pravděpodobně za největší omezení této technologie, které brání jejímu eventuálnímu rozšíření do klinické praxe lze považovat nutnost tvorby panelů vyšetření, aby bylo maximálně využito potenciálu této analýzy tzn. možnosti stanovit z jednoho patientského vzorku více analytických parametrů současně a nutnost kompromisu při hledání vhodného materiálu (sérum-plazma) pro stanovení metod v rámci sestaveného panelu (Rabia H: 2010; Rubenstein K: 2010). Za další nevýhodu lze považovat i nemožnost provádění statimových vyšetření z důvodu potřeby nasbírání série vzorků, i když toto omezení platí i pro ELISA. V poslední době lze u výrobců biočipových technologií objednat panel vyšetření dle požadavků zákazníka, což do určité míry eliminuje hlavní

nevýhodu těchto technologií. Některé z námi měřených molekul, jako například TFF-3, chemerinu, S100A nebo Dkk-1 lze již stanovit s využitím biočipové technologie (například Randox).

V rámci hledání možností stanovení nových molekul pro laboratorní diagnostiku vybraných onemocnění jsme se z výše uvedených důvodů zaměřili na vývoj nového ELISA testu, pomocí něhož bychom byli schopni stanovit jejich koncentraci v séru, plazmě nebo likvoru.

Při návrhu testu jsme vycházeli z dostupných odborných informací popisujících vlastnosti těchto molekul, znalosti jejich exprese v různých tkáních i hypotézy o jejich možném klinickém využití. Při vývoji a prvotním nastavení testu jsme se inspirovali i odbornými rešeršemi popisujícími obecné postupy pro měření cytokinů metodou ELISA. V době vývoje ELISA souprav nebyla na trhu dostupná žádná validovaná ELISA souprava jiného výrobce, proto jsme při tvorbě plánu pro ověření analytických charakteristik ELISA souprav vycházeli z doporučení ČSKB pro provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích (Friedecký B: 2011) a ze standardů (vnitřní norma v systému řízení spolupracující komerční společnosti, která vyvíjí diagnostické ELISA soupravy pro vědu a výzkum ([www.biovendor.com](http://www.biovendor.com))).

Při vývoji nových testů ELISA se ve většině případů netestují všechny teoretické kombinace (například všechny kombinace použití roztoků, kombinace vazebných protilátek a konjugátů atd.), ale na základě očekávaných koncentrací stanoveného analytu ve vzorku, se volí vstupní nastavení a korigují se pouze ty parametry, které jeví největší změnu výsledného signálu při relativní změně zvolených parametrů (nejčastěji jde o množství protilátky na mikrotitrační desce, koncentrace konjugátu, inkubační čas a teplota a koncentrace aktivní složky v ředícím/stabilizačním roztoku). Až ve druhé fázi testování se volí kalibrační rozsah a stupeň ředení vzorku.

V rámci této disertační práce jsme vyvinuli a optimalizovali diagnostické soupravy pro stanovení koncentrací vybraných molekul: VILIPu-1, sekretagoginu, chemerinu, PEDF, PSP-94 a TFF-1/2/3, Dkk-1 a S100A-11. Při ověřování funkčnosti ELISA souprav jsme testovali jejich vybrané analytické charakteristiky podle předem připraveného validačního plánu. Zjistili jsme, že všechny námi vyvinuté ELISA soupravy měly uspokojivé analytické charakteristiky. Pokud jsme při testování vlivu matrice vzorku (sérum, plazma) na výsledek měření porovnávali poměr průměrných koncentrací daného analytu v plazmě k jeho koncentraci v séru, zjistili jsme, že v případě stanovení Dkk-1 a S100A-11 je vhodnější používat jako materiál pouze sérum, což neovlivňuje jejich uvažované použití v praxi. Potencionální klinickou diagnostickou využitelnost ELISA souprav jsme ověřili v devíti klinických studiích. Na základě poznatků, vyplývajících z provedených klinických studií a z toho,

že většina z nově vyvinutých ELISA souprav našla uplatnění na řadě pracovišť, se domníváme, že by mohlo jít o nezávislé a potenciální ukazatele využitelné nejen ve vědeckých studiích, ale pravděpodobně i při diagnostice vybraných onemocnění hromadného výskytu.

## 5.1 Osteokrin

V naší práci jsme sestavili ELISA test pro stanovení koncentrace Osteokrinu a snažili se v rámci pilotní studie ověřit jeho funkci v klinické praxi. Z našich výsledků vyplynulo, že u sledovaných osob nebyly zjištěny žádné souvislosti mezi hodnotami Ostn a ostatními měřenými ukazateli. Hodnoty Ostn se nelišily ani podle pohlaví, podle výskytu rezistence k inzulinu ani výskytu dyslipidemie. Nebyly tedy potvrzeny hypotézy o souvislosti mezi koncentrací Ostn v séru a antropometrickými i laboratorními ukazateli energetického a glukózového metabolismu, respektive o jeho možném využití v laboratorní diagnostice nejčastějších poruch energetického metabolismu (obezita, metabolický syndrom) (1).

## 5.2 PEDF

PEDF produkovaný adipocyty je ve zvýšené míře exprimován u obézních jedinců, u osob s metabolickým syndromem a u pacientů s diabetem mellitem 2. typu. V poslední době je uvažována jeho funkce při rozvoji inzulinové rezistence (Crowe S et al: 2009). PEDF totiž zvyšuje lipolýzu v adipocytech a podílí se na akumulaci lipidů ve svalch a v játrech, což je následně spojeno se vznikem inzulinové rezistence (Crowe S et al: 2009). Gattu a kolektiv ve své práci zjišťovali, zda-li koncentrace PEDF v séru souvisí se stupněm inzulinové rezistence u obézních osob. Zjistili, že vzestup sérové koncentrace PEDF je spíše spojen s inzulinovou rezistencí než s množstvím tukové tkáně, na základě čehož vyslovili hypotézu, že stupeň exprese PEDF těsně souvisí s rozvojem inzulinové rezistence (Gattu AK et al: 2012). PDEF by mohl být také potencionálním ukazatelem postprandiální hyperlipidémie, jelikož bylo zjištěno, že koncentrace PEDF v séru byla nezávisle spojena s koncentrací apoB-48 (Tahara N et al: 2012). Zvýšené hodnoty PEDF u obézních jedinců s rezistencí na inzulin byly nalezeny, nezávisle na pohlaví, i u dětské populace (Sunderland KL et al: 2012).

Jelikož bylo prokázáno, že PEDF má protizánětlivé účinky, existuje hypotéza, že zvýšené plazmatické hladiny PEDF nalezené u diabetiků s mikrovaskulárními komplikacemi mají pravděpodobně u těchto osob protektivní účinek. Je možné, že zvyšující se koncentrace PEDF by mohla spíše než patofyziologickým faktorem být průvodním jevem metabolického syndromu

(Liu X et al: 2013). Tuto hypotézu potvrzuje i nedávno prezentovaná studie, ve které bylo sledováno několik desítek hemodialyzovaných pacientů. Bylo prokázáno, že snížení hodnoty PDEF jsou nezávislým rizikovým faktorem kardiovaskulární i celkové mortality (Terawaki H et al: 2013). S tím nezávisle souvisí i další studie, která prokázala, že PEDF má antiagregační účinky (Yamagishi S et al: 2010).

Recentní data uvádí skutečnost, že PEDF vede k aktivaci PPAR $\gamma$ . Na základě těchto informací vzniká domněnka, že PEDF by mohl být potenciální cílovou molekulou pro terapii cévních proliferativních chorob (Wang SH et al: 2012).

V rámci naší práce jsme potvrdili, že koncentrace PEDF v séru souvisí u kavkazské populace (stejně jako u jiných etnik) s parametry a přítomností metabolického syndromu. Na základě naší pilotní studie jsme vyslovili domněnku, že PEDF by mohl být nezávislý ukazatel přítomnosti metabolického syndromu. Závěrem lze říci, že koncentrace PEDF v séru je zvýšená u pacientů s metabolickým syndromem a mohlo by jít z diagnostického hlediska o potenciální ukazatel přítomnosti a snad i závažnosti metabolického syndromu (2).

## 5.3 VILIP-1

Nedávno byly prezentovány pilotní studie, které popisují využití stanovení koncentrace VILIP-1 v likvoru (indexu VILIP 1/Amyloid- $\beta$  (1-42) v diagnóze neuronálního poškození a zejména rozlišení mezi Alzheimerovou demencí (AD) a demencí způsobenou Lewyho tělisky (DLB). Koncentrace VILIP-1 v likvoru byla významně zvýšena u pacientů s AD v porovnání s pacienty s diagnózou DLB nebo zdravými jedinci. Na základě těchto nálezů byla prezentována hypotéza o potenciální možnosti využití stanovení koncentrace VILIP-1 v likvoru a poměru VILIP 1/Amyloid- $\beta$  (1-42) pro detekci a diferenciální diagnostiku AD (Luo X et al: 2013; Tarawneh R et al: 2012). Toto tvrzení podporuje i nález jiných autorů, kteří prokázali, že koncentrace VILIP-1 v likvoru souvisí s koncentrací fosforylovaného  $\tau$ -proteinu (181P) v likvoru (Luo X et al: 2013). Koncentrace VILIP-1 v likvoru také souvisí s neuronální atrofií v časných stádiích AD a proto by mohlo být její stanovení použito jako prediktivní ukazatel eventuálního poškození kognitivních funkcí u zdravých jedinců (Tarawneh R et al: 2012; Hasegawa S et al: 2013). V rámci naší pilotní studie s nově vyvinutou ELISA soupravou byl potvrzen předpoklad, že pacienti s mozkovou příhodou mají vyšší hodnoty VILIP-1v séru i likvoru než osoby bez neurologického postižení. Námí publikované výsledky tedy podporovaly tehdejší hypotézu, že VILIP-1 by mohl být efektivním sérovým diagnostickým ukazatelem přítomnosti mozkové příhody (3,4). Mezi největší omezení této studie patří systém výběru kontrolní skupiny zdravých osob. Definice kontrolní skupiny tzv. zdravých jedinců totiž nevylučuje přítomnost méně významného poškození nebo onemocnění

CNS u kontrolního souboru. Jak bylo totiž uvedeno výše a publikováno později, po naší práci, koncentrace VILIP-1 souvisí s neurodegenerativními a neurodestrukčními ukazateli CNS. Hlavním účelem této pilotní studie bylo pouhé zjištění patofyziologického vztahu mezi koncentrací VILIP-1 (především v séru) a jinými ukazateli, a také hledání souvislostí mezi poškozením mozkové tkáně ischemickou CMP a koncentrací tohoto proteinu v séru i likvoru. Určení faktu, jestli je VILIP-1 nezávislý a specifický ukazatel poškození CNS nebo nezávislý ukazatel mozkové ischemie, přesahuje rámec této studie z důvodu omezeného počtu testovaných osob, nicméně naše výsledky potvrzují, že koncentrace VILIP-1 v séru by mohl být slibný ukazatel poškození CNS. Nejvíce si na této práci ceníme prioritního zjištění dostatečné efektivity stanovení tohoto proteinu v séru; odběr likvoru je na rozdíl od venepunkce zatížen významně vyšším rizikem a není standardní diagnostickou procedurou u pacientů s podezřením na mozkovou příhodu (3,10).

## 5.4 SCGN

SCGN je ve zvýšené míře exprimován neuroendokrinními buňkami a má neuroprotektivní účinky při neurodegenerativních onemocněních mezi něž patří například Alzheimerova demence (Kosaka K et al: 2013).

V rámci první části našeho projektu a pilotní studie s ověřením diagnostické efektivity stanovení koncentrace sekretagoginu v séru pomocí nově vyvinuté ELISA metody jsme zjistili, že se koncentrace SCNG u pacientů s kraniotraumatem nelišila v porovnání se stanovením koncentrace S100, byla však významně vyšší než u stanovení koncentrace pNF-H, GFAP i Hsp70. Prakticky si tedy tuto skutečnost vysvětlujeme tak, že tento ukazatel není diagnostiky přínosnější u uvedené skupiny pacientů než stanovení jiných zavedených parametrů (S100).

V rámci výsledků druhé části našeho projektu jsme v rámci pilotní studie definovali referenční meze u zdravých fyziologických novorozenců.

Jelikož jsme nenalezli žádné souvislosti s dalšími stanovenými parametry, chtěli bychom v budoucnu ověřit možné využití stanovení tohoto proteinu ke sledování některých mozkových funkcí u nezralých novorozenců, kdy je stávající diagnostika zatížena potenciálně vysokou chybovostí. Na tomto projektu dále pracujeme (11,12).

## 5.5 Dkk-1

Informace o významu Dkk-1 jsou rozporuplné, protože některé autorské skupiny nenalezly vztahy mezi Dkk-1 v séru, parametry kostního obratu a stavem kostní hmoty (Cejka D et al: 2011; Bodine P V: 2008; Pecina-Slaus N: 2010); jiní autoři však prokázali, že produkce tohoto parametru souvisí s kostním metabolismem.

Současně byla publikována práce, která uváděla, že osoby se sníženou kostní hmotou by mohly mít hladinu Dkk-1 v séru zvýšenou, například u pacientů s Pagetovou chorobou, kde se koncentrace Dkk-1 v séru (společně s expresí sklerostinu) významně zvyšuje. Toto zvýšení bylo nezávislé na pohlaví a věku a nekorelovalo s aktivitou alkalické fosfatázy (Michael J et al: 2009; Beauregard M et al: 2013).

Zdá se, že osoby s vyšší koncentrací Dkk-1 (někdy jsou uváděny hodnoty kolem  $22,6 \mu\text{g l}^{-1}$ ) mají horší prognózu průběhu nemoci a přežití než pacienti u nichž je koncentrace Dkk-1 v séru nižší než uvedená hodnota (Jiang T et al: 2013). Vysoké hodnoty Dkk-1 v séru lze obecně považovat za prognostický ukazatel (Jiang T et al: 2013).

Vzhledem k tomu, že v době účasti na uvedeném projektu nebyly cíleně sledovány ani popsány souvislosti mezi Dkk-1 a parametry kostního obratu či kostní denzitou v několika lokalitách, vyjádřenou jako T skóre, bylo pro nás zajímavé důležité zjištění, že v rámci pilotní klinické studie byly u sledovaných pacientů nalezeny významné rozdíly mezi hodnotami Dkk-1 podle přítomnosti osteoporózy. Významnost rozdílů přetrvávala i po adjustaci na pohlaví, věk a další sledované parametry. Na základě našich nálezů se domníváme, že při použití uvedené diagnostické soupravy by mohlo být stanovení koncentrace Dkk-1 v séru potenciálním pomocným ukazatelem, který by mohl být využit pro diagnostiku osteoporózy. Naše hypotéza však musí být potvrzena nezávislými multicentrickými studiemi (5, 13).

## 5.6 Chemerin

Na základě nových poznatků se předpokládá, že bílá tuková tkáň slouží jednak jako primární zdroj sekrece chemerinu a zároveň jako cíl autokrinního/parakrinního působení chemerinu. Zásadní role chemerinu a jeho receptoru je regulace adipogeneze a metabolické homeostázy v adipocytech myši i lidí (Goralski K B et al: 2007).

Expresce chemerinu u neobézních lidí bílou tukovou tkání je daleko vyšší než hnědou tukovou tkání (Goralski K B et al: 2007). Chemerin a jeho receptor z velké části potlačují diferenciaci adipocytů. Z tohoto důvodu hraje chemerin důležitou roli v časně fázi regulace diferenciace a růstu adipocytů. Tato regulace může následně vést k nižší expresi perilipinu, GLUT4 (inzulinem regulovaný transportér pro glukózu), adiponektinu a leptinu zralými adipocyty. Cirkulující chemerin je považován za nový adipokin, který může ovlivňovat glukózovou toleranci a hyperlipidémii ve vztahu k obezitě, diabetu mellitu a kardiovaskulárním onemocněním (Yamamoto T et al: 2010). Nedávno byly hledány souvislosti mezi koncentrací chemerinu v séru a ischemickou chorobou srdeční (ICHS); bylo zjištěno, že chemerin souvisí s výskytem ICHS, jakož i se závažností koronárních lézí (Aronis K N et al: 2014).

Současně bylo, stejně jako v naší studii potvrzeno, že chemerin souvisí s hodnotou

BMI, inzulinovou rezistencí, krevním tlakem, koncentrací triacylglycerolů a negativně koreluje s koncentrací adiponektinu a HDL cholesterolem (Aronis N K et al: 2014). Jiná studie potvrdila, že zvýšená hladina chemerinu byla nalezena u jedinců s centrálním typem obezity a u pacientů s nealkoholickou steatohepatitidou (Roman AA et al: 2012). Při hubnutí docházelo ke snížení exprese chemerinu buňkami tukové tkáně a ke snížení koncentrace cirkulujícího chemerinu v krvi (Chakaroun R et al: 2012). Bylo zjištěno, že hladinu chemerinu také nepřímo ovlivňuje intenzita fyzické zátěže (Polyzos S A et al: 2014).

Na naší pilotní studii si ceníme faktu, že jsme jako jedni z prvních upozornili na paradoxní vztah mezi metabolickým syndromem a jeho parametry a koncentrací chemerinu. Naše nálezy byly během let opakovaně citovány a bylo jich využito při hledání nových východisek v rámci jiných studií.

V rámci našeho projektu byla na skupině jedinců s vysokým rizikem metabolického syndromu zjištěna významně zvýšená koncentrace chemerinu v séru v porovnání s jedinci bez přítomnosti metabolického syndromu nebo zdravými jedinci. Bylo zjištěno, že koncentrace chemerinu v séru je spojena se složkami metabolického syndromu i dalšími prozánětlivými cytokiny, a že stanovení koncentrace chemerinu může být nezávislý marker přítomnosti metabolického syndromu (9).

## 5.7 PSP-94

Diagnosticky zajímavým ukazatelem v rámci onkologie, resp. diagnostiky karcinomu prostaty (CaP) by mohl být prostatický sekreční protein (PSP-94). Lze předpokládat, že PSP-94 má více systémových funkcí, mezi něž například patří regulace růstu, indukce apoptózy nádorových buněk prostaty a v imunitní ochraně spermatozoí v ženském genitálním traktu (vazbou na imunoglobulin G prostřednictvím Fab domény a zabránění ve vazbě IgG na spermatozoa). Kromě prostaty byl PSP-94 nalezen například i v tracheálním sekretu (Laurence M:2013).

Má se za to, že PSP-94 inhibuje sekreci FSH, který stimuluje růst nádorových buněk v prostatě. Tento předpoklad byl ovšem vyvrácen dalšími studiemi a doposud tento účinek PSP-94 na inhibici sekrece FSH nebyl potvrzen (Laurence M:2013).

Fungicidní vlastnosti PSP-94 byly poprvé popsány v roce 2010, kdy v prostředí s nízkým pH ( $\text{pH} < 5$ ) má PSP-94 fungicidní účinky na *Candida albicans* a ostatní kvasinky. Fungicidní aktivitu má C-terminální fragment PSP-94. (Laurence M:2013).

Nízká koncentrace PSP-94 je jedním z rizikových faktorů vzniku karcinomu prostaty (Laurence M:2013).

Rakovina prostaty a BPH jsou důsledkem chronického zánětu prostaty, který postihuje asi 41% mužů středního věku a asi 80% mužů v důchodovém věku. Tento



zánět je důsledkem autoimunitního onemocnění, které je pravděpodobně způsobeno sexuálně přenášenou infekcí. Chronický zánět prostaty je autoimunitní onemocnění s nejvyšší prevalencí v populaci (Laurence M:2013). Pro vysvětlení protektivního působení PSP-94 proti rakovině prostaty byly diskutovány dvě hypotézy. První hypotéza předpokládá supresi intracelulární infekce působením PSP-94, respektive jeho C-terminální části. Druhá hypotéza uvažuje působení N-terminální části PSP-94 při inhibici rozvoje nádorového bujení (Laurence M:2013).

Karcinom prostaty (CaP) je závažné maligní onemocnění s druhou nejvyšší mortalitou u mužů, které bývá často spojeno s metastázemi ve skeletu. U pozdních stadií CaP nacházíme v experimentech snížení exprese PSP-94; naopak jedinci s vyšší koncentrací PSP-94 mívají lepší prognózu. Tyto údaje je však nezbytné ověřit v klinických studiích.

Zdá se, že PSP-94 reaguje v prostatické tkáni společně s CRISP-3 (Pathak B T et al: 2010).

Vzhledem k potencionálnímu využití stanovení koncentrace PSP-94 v séru jako ukazatele rizika vzniku nádorového onemocnění prostaty jsme se pokusili vyvinout novou ELISA metodu pro stanovení PSP-94 v séru a ověřit její diagnostickou efektivitu klinickou studií jejímž cílem bylo ověřit souvislost s celkovým a volným PSA u osob s chronickou prostatitidou a jedinců po radikální prostatektomii pro karcinom (RAPPE). Zjistili jsme, že koncentrace PSP-94 v séru souvisela s koncentrací PSA a volným PSA v séru. Osoby po RAPPE měly nejnižší hodnoty PSA, nicméně v hodnotách PSP-94 se testovaní pacienti významně nelišili, i když jedinci po RAPPE měli hodnoty nejnižší. Souvislost mezi Gleasonským skóre a koncentrací PSP-94 v séru se nepodařilo prokázat. Závěrem lze říci, že PSP-94 těsně souvisí s celkovým a volným PSA a lze ho pravděpodobně využít jako doplňující prognostický ukazatel v laboratorní diagnostice karcinomu prostaty (15).

## 5.8 TFF

TFF-1 se podílí na diferenciaci buněk v G1-S fázi buněčného cyklu v GIT, před a po snížení apoptózy (Bossenmeyer Pourié C et al: 2002).

Mezi nejčastější funkcí TFF-1 v GITu (žaludek, tenké střevo, slinivka), kde je lokalizován s mucinem (MUC5AC), patří hojení a stabilizace slizniční vrstvy. Převážně ho tvoří buňky na povrchu sliznice zažívacího traktu (Ruchand-Sparagano M H et al: 2004; Sasaki M et al: 2007). TFF-1 snižuje proliferaci buněk tím, že snižuje G1-S fázový přechod (Bossenmeyer-Pourié C et al: 2002). Bylo prokázáno, že zpoždění buněčného cyklu vede k progresi v buňkách žaludečního karcinomu (Perry J K et al: 2007). Z toho vyplývá, že TFF-1 zprostředkovává zvýšení hladiny inhibitorů

cyklin-dependentních kináz. Mezi další funkce TFF-1 patří ochrana buněk před apoptózou. V tomto procesu se TFF-1 signalizace zaměřuje na aktivaci kaspázy-9. Tyto vlastnosti ukazují na antiproliferační a antiapoptické funkce TFF-1 (Bossenmeyer-Pouric C et al: 2002). TFF-1 se vyskytuje i ve slinných žlázách, dýchacích cestách a oční sliznici (Buache et al: 2011). Lze ho nalézt v epitelálních buňkách a submukózních žlázách nosní sliznice, v řasinkových buňkách průdušnice a průdušinek (Madsen J et al: 2007).

V dýchacích cestách je TFF-1 hlavní luminární složka a to zejména v subslizniční žláze spolu s MUC5B (Oertel M et al: 2001).

Koncentrace TFF-1 se zvyšuje především při zánětlivých stavech (Buron N et al: 2005). Při vředech způsobených bakterií *Helicobacter pylori* byla prokázána snížená hladina TFF-1 (Kato S et al: 2004). Často je také jeho výskyt spojován s chronickou ulcerózní kolitidou v GIT a s vředy tvořenými buněčnou linií UACL (Pera M et al: 2001). U ulcerózních a akutně zánětlivých střevních onemocnění jako jsou Crohnova choroba, duodenální vřed nebo hemoragická rektokolitida je TFF-1 ektopicky vyjádřený po celé délce GIT (Bossenmeyer-Pouric C et al: 2002; Kouznetzova I et al: 2007). Zvýšená koncentrace TFF-1 byla rovněž prokázána při alergiích, kdy je TFF-1 tvořeno sliznicí průdušnice.

TFF-1 dále přispívá k efektivní mobilitě buněk, které mohou být důležité pro invazi a metastazující vlastnosti agresivního karcinomu prsu (Espino P et al: 2006). Buňky rakoviny prsu produkují značné množství monomerů i dimerů TFF-1 (Prest S J et al: 2002). Je tedy možné ho využít jako jeden z ukazatelů při diagnostice a prognóze rakoviny prsu. Z toho důvodu bývá TFF-1 označován za tumor supresorový gen (Blin N: 2005; Espino P et al: 2006). Nedostatek TFF-1 zvyšuje možnost rozvoje rakoviny prsu a nádorů prsních žláz. Tento efekt je pozorovatelný až u 50 % nádorů prsu u testovaných jedinců. Nízká koncentrace nebo mutace v genu TFF-1 byla často prokázána u žaludečních karcinomů (Bossenmeyer-Pouric C et al: 2002), kde TFF-1 podporuje buněčnou invazi a blokuje apoptózu (Dardaei L et al: 2011). TFF-1 způsobuje inhibici růstu adenokarcinomu v lidském žaludku (Bossenmeyer-Pouric C et al: 2002). Bylo také prokázáno, že dimerická forma TFF-1 mírně snižuje počet buněk karcinomu žaludku. U monomerní formy toto působení prokázáno nebylo (Perry J K et al: 2007).

TFF-1 má současně schopnost výrazně snižovat počet buněk v GIT. Tuto teorii potvrdil test TFF-1 na životaschopnost diploidních střevních buněk IEC18 u krysa a u lidí HCT116 (rakovina tlustého střeva) a AGS (rakovina žaludku). Přidáním 0,1-50  $\mu\text{M}$  rekombinantního lidského TFF-1 se snížil počet testovaných buněčných linií v kultivačním médiu. Tento jev byl pozorován již u přídatku 0,1  $\mu\text{M}$  TFF-1. Celkový pokles na konci experimentu byl o 20 % u IEC18, o 25 % u HCT116 a o 30 % u AGS (Bossenmeyer-Pouric, 2002). U invazivního intrahepatálního cholangiokarcinomu

(ICC) dochází k výraznému snížení koncentrace TFF-1. Tato snížená exprese může být vysvětlena metylací v molekule TFF-1 (Sasaki M et al: 2003).

TFF-2 je v největší míře produkován buňkami sliznice žaludku, tlustého střeva a slinivky a bývá často označován jako spasmolytický polypeptid (SP) (Rodrigues S et al: 2003), spasmolysin (SML1), prasečí spasmolytický polypeptid (PSP) nebo jeho lidská varianta jako lidský spasmolytický polypeptid (HSP) (Alazzez E: 2001; Suemori S et al: 1991). TFF-2 obsahuje dvě trojlístkové domény a má velmi kompaktní strukturu, která může odpovídat za jeho extrémně vysokou odolnost v prostředí GIT. TFF-2 působí synergicky s glykoproteiny mucinu a zvyšuje ochranu střevního epitelu před škodlivými látkami (Cooke G A et al: 1999). Z trávicího traktu je vylučován téměř v nemetabolizované formě (Poulsen S S et al: 1998). TFF-2 má krátký poločas rozpadu, a je volně filtrován ledvinami (Vestergaard E M et al: 2002). Přesná funkce TFF-2 nebyla dosud plně objasněna. Má však schopnost stimulovat epiteliální buňky, jejich migraci při hojení ran a potlačení apoptózy buněk (Zhang Y Q et al: 2010).

Prokázalo se, že stejně jako TFF-1 má i TFF-2 souvislost s Crohnovou chorobou, kdy se jeho koncentrace v séru rovněž při této chorobě zvyšuje. TFF-2 se v séru ve vyšších koncentracích objevuje také u pacientů v sepsi, kdy koncentrace TFF-2 koreluje s prognózou septického stavu. V okolí poškozené sliznice dochází k rychlé indukcii tvorby TFF-2, přibližně do 30 min. Tím přispívá k rychlejšímu hojení poškozené sliznice a zvýšení buněčné motility (Dhar D K et al: 2005). Zvýšené hodnoty TFF-2 jsou prokázány u velkých nádorů a v pokročilých stádiích rakoviny žaludku. TFF-2 je možné považovat za prognostický ukazatel nádorového onemocnění žaludku. Buněčná lokalizace TFF-2 je charakteristická nejen pro nádorové onemocnění žaludku, ale pro každý histologický typ těchto orgánových nádorů. U difúzního karcinomu žaludku je zvýšená koncentrace TFF-2 v cytoplazmě, u střevního typu rakoviny žaludku se vyskytuje převážně v buněčných membránách (Dhar D K et al: 2005). Vysoké hodnoty TFF-2 lze nalézt v séru při rakovině prostaty, prsu, tlustého střeva nebo nádorech vaječníků. Nedostatek TFF-2 vede ke zhoršení obnovy tkání a imunitní obrany (Lemberger S I K et al: 2010).

TFF-3 je nízkomolekulární protein, 8,6 kDa (Xue H et al: 2010), který je produkován zejména buňkami sliznice tenkého a tlustého střeva (Kalabis J et al: 2006) a z nich je vylučován do lumen střevního traktu (Yu K et al: 2004). TFF-3 má cytoprotektivní účinek ve střevech a v GIT podporuje hojení ran, stimuluje migraci epitelových buněk a chrání povrch střevního epitelu (Tan X D et al: 2008). Koncentrace TFF-3 na sliznicích je asi 0,1× nižší než v tenkém střevě. Nedávno bylo zjištěno, že se ve zvýšené míře vyskytuje v ostrůvcích pankreatu, kde přispívá ke zvýšení proliferace buněk Langerhansových ostrůvků (Fueger P T et al: 2008). TFF-3 se syntetizuje v slzném kanálku (Paulsen F P et al: 2002), ale nevyskytuje se

ve zdravém epitelu rohovky. Po epiteliálním poranění rohovky, ovšem dochází ke značné produkci tohoto peptidu, z čehož vyplývá klíčová úloha TFF-3 při hojení ran rohovky (Paulsen F P et al: 2008).

Zdá se, že stanovení koncentrace TFF-3 v séru by se mohlo stát efektivním ukazatelem při laboratorní diagnostice střevních nádorů, v porovnání například s používaným stanovením pepsinogenu v séru (Japonsko), kde senzitivita pro stanovení pepsinogenu byla asi 45 % a specifčnost 87,4 %, kdežto při stanovení TFF-3 byla senzitivita 80,9 % a specifčnost 81 %. Ještě vyšší senzitivity lze dosáhnout kombinací obou těchto testů (Aikou S et al: 2011).

TFF-3 je také produkován epitelem dělohy a je rovněž obsažen v děložním sekretu. Ve vyšších koncentracích se nachází při proliferaci a estrogenem řízené fázi menstruačního cyklu (Baus-Loncar M et al: 2005).

Abnormální uvolnění TFF-3 bylo zdokumentováno u karcinomu žaludku, prostaty, kůže, papilárním acinózním nádoru ve slinivce a rakovině prsu (Haruhiko O et al: 2005; Bignotti E et al: 2008). Zdá se, že stanovení hladiny TFF-3 je důležitý prognostický údaj u některých druhů malignit. Stále není známo, zda se TFF-3 přímo podílí na maligním chování nádorových buněk. I přes tento poznatek má pravděpodobně TFF-3 důležitý diagnostický potenciál jako nový nástroj pro hodnocení předoperačního a pooperačního sledování pacientů s endometriózou. V rámci naší pilotní studie jsme prokázali, že zvýšenou koncentraci TFF proteinů v séru lze nalézt i v průběhu patologických změn endometria. Zjistili jsme, že pacienti s karcinomem endometria měli významně zvýšené hladiny S100A-11 a TFF-3 v séru. Vzhledem k tomu, že jsme nenalezli žádné rozdíly v koncentracích TFF-1, TFF-2, AIF-1 a Ca 125 bylo jako diagnostický ukazatel první volby pro diagnózu karcinomu endometria doporučeno pouze stanovení koncentrace S100A-11 v séru (16, 24). Tento náš nález považujeme významný z hlediska testování uvedených proteinů.

## 5.9 S100A-11

Proteiny rodiny S100 hrají roli v regulaci řady buněčných procesů. Jednotlivé proteiny typu S100 jsou přítomny v řadě specifických tkání a ovlivňují řadu specifických nemocí včetně karcinomů (mimo jiné i indukci apoptózy) (Makino et al: 2004). Nedávno bylo prezentováno využití S100A-11 jako biomarkeru u infekční endokarditidy (Thuny F et al: 2012).

V rozvoji nádorového bujení hraje S100A-11 odlišnou úlohu v závislosti na místě (orgánu) vzniku tumoru. V případě tumorů močového měchýře nebo ledvin je pozorována zvyšující se exprese S100A-11 s rostoucí supresí tumoru, a naopak u tumorů prostaty, plic nebo pankreatu se uvažuje o funkci S100A-11 jako promoteru vzniku tumoru (Makino et al: 2004).

K velice rozšířeným karcinomům u žen patří i karcinomy endometria. V tomto případě je diagnostika založena na histologické analýze bioptického vzorku a doposud nebyl v době konání projektu zaveden do klinické praxe relevantní test, který by umožňoval diagnostiku karcinomů na základě biochemických testů. V naší studii jsme se zaměřili na využití stanovení koncentrace S100A-11 při diagnostice karcinomů endometria. Podle předpokladů jsme prokázali, že ženy s karcinomem endometria měly významně zvýšené sérové hodnoty S100A-11 a stanovení koncentrace S100A-11 lze tedy použít jako ukazatel první volby při laboratorní diagnostice karcinomu endometria (24).

Na základě poznatků, vyplývajících z provedených klinických studií a z toho, že většina z nově vyvinutých ELISA souprav našla uplatnění na řadě pracovišť, se lze domnívat, že by mohlo jít o potenciální ukazatele využitelné nejen ve vědeckých studiích, ale pravděpodobně i při rutinní či pomocné diagnostice vybraných onemocnění hromadného výskytu.

Řada nově vyvinutých ELISA souprav našla využití zejména v řadě vědeckých studií, ale i v klinické praxi (tab. 116).

## Tabulka 116

Autoři a pracoviště využívající nově vyvinuté ELISA soupravy

Název ELISA	Autoři	Pracoviště
<i>VILIP-1 Human ELISA</i>	Hasegawa S, et al: 2013	Department of Pediatrics, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Japan
<i>Secretagogin Human ELISA</i>	Puthussery T, et al: 2011	Oregon Health and Sciences University, Portland, Oregon
	Žurek J, et al: 2011	Klinika dětské anesteziologie a resuscitace, FN Brno
<i>Dkk-1 Human ELISA</i>	Mořovská Z, et al: 2012	III. interní-kardiologická klinika, 3 LF UK, Praha
	Aronis KN, et al: 2014	Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts
<i>Chemerin Human ELISA</i>	Chakaroun R, et al: 2012	University of Leipzig, Leipzig, Germany
	Chamberland JP, et al: 2013	Boston VA Healthcare System, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts
	Eisinger K, et al: 2012	Regensburg University Hospital, Regensburg, Germany
	El-Mesallamy HO, et al: 2011	Faculty of Pharmacy, Ain Shams University, Cairo, Egypt
<i>Chemerin Human ELISA</i>	Ouwens DM, et al: 2012	German Diabetes Center, Duesseldorf, Germany
	Pfau D, et al: 2010	University of Leipzig, Leipzig, Germany
	Ress C, et al: 2010	Medical University Innsbruck, Innsbruck, Austria
	Saremi A, et al: 2010	University of Arak, Arak, Iran
	Sell H, et al: 2010	German Diabetes Center, Düsseldorf, Germany
	Stepan H, et al: 2011	University of Leipzig, Department of Obstetrics, Germany
	Tönjes A, et al: 2010	University of Leipzig, Leipzig, Germany
	Yilmaz Y, et al: 2011	Marmara University School of Medicine, Altunizade, Istanbul, Turkey
<i>PSP-94 Human ELISA</i>	Prezentovano námi. Publikace jiných autorů v přípravě.	PSP-94 Human ELISA
<i>TFF-1 Human ELISA</i>	Žurek J, et al: 2013	Klinika dětské anesteziologie a resuscitace, FN Brno
<i>TFF-2 Human ELISA</i>	Žurek J, et al: 2013	Klinika dětské anesteziologie a resuscitace, FN Brno
	Samson MH, et al: 2011	Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark

<b><i>TFF-3 Human ELISA</i></b>	Samson MH, et al: 2011	Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark
<b><i>Osteocrin Human ELISA</i></b>	Prezentovano námi. Publikace jiných autorů v přípravě.	Osteocrin Human ELISA
<b><i>S100A-11 Human ELISA</i></b>	Prezentovano námi. Publikace jiných autorů v přípravě.	S100A-11 Human ELISA
<b><i>PEDF Human ELISA</i></b>	Catalioto RM, et al: 2013	Menarini Ricerche SpA, Florence, Italy
	Chen C, et al: 2010	Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong
	Tschoner A, et al: 2011	Medical University Innsbruck, Innsbruck, Austria
	Yilmaz Y, et al:2011	Marmara University, School of Medicine, Istanbul, Turkey

## 6. Závěry

V rámci spolupráce na vývoji ELISA souprav pro specifická stanovení koncentrací vybraných molekul byly vyvinuty diagnostické soupravy pro stanovení osteokrinu, PEDF, VILIP-1, sekretagoginu, chemerinu, PSP-94, TFF-1/2/3 v séru i plazmě. Dkk-1 a S100A-11 bylo doporučeno stanovovat pouze v séru. VILIP-1 lze stanovit v séru i v likvoru. Všechny ELISA soupravy vykazovaly uspokojivé analytické charakteristiky a potencionální klinická diagnostická využitelnost byla ověřena v devíti klinických studiích. V rámci pilotních studií bylo zjištěno:

1. U sledovaných osob nebyly zjištěny žádné souvislosti mezi hodnotami osteokrinu a ostatními měřenými ukazateli. Hodnoty osteokrinu se nelišily ani podle pohlaví, podle výskytu rezistence k inzulinu ani výskytu dyslipidemie a nebyly tedy potvrzeny hypotézy o souvislosti mezi koncentrací osteokrinu v séru a antropometrickými i laboratorními ukazateli energetického a glukózového metabolismu, resp, o jeho možném využití v laboratorní diagnostice nejčastějších poruch energetického metabolismu (obezita, metabolický syndrom) (1).
2. Při zkoumání vztahu mezi koncentrací PEDF a přítomností metabolického syndromu u kavkazské populace bylo zjištěno, že osoby s metabolickým syndromem měly prokazatelně vyšší koncentrace PEDF v séru než zdravé osoby. Z analýzy dat vyplynulo, že koncentrace PEDF v séru je nezávislým ukazatelem přítomnosti metabolického syndromu. Koncentrace PEDF korelovala s BMI, CRP, diastolickým krevním tlakem, inzulinem a testem citlivosti k inzulinu (Quicki) (2).
3. Byl potvrzen předpoklad, že pacienti s mozkovou příhodou mají vyšší hodnoty VILIP-1 v séru než osoby bez neurologického postižení. První výsledky tedy podporují nedávno publikovanou hypotézu, že VILIP-1 by mohl být efektivním sérovým ukazatelem přítomnosti mozkové příhody. Určení toho, jestli je VILIP-1 protein nezávislý a specifický ukazatel poškození CNS nebo nezávislý ukazatel ischemie mozku, přesahuje rámec této studie z důvodu omezeného počtu souboru osob (3, 4,10).
4. Diagnostická efektivita stanovení sekretagoginu u pacientů s kraniotraumatem se nelišila od efektivity stanovení S100, byla však významně vyšší než u pNF-H a GFAP. Byly stanoveny referenční hodnoty u fyziologických zdravých novorozenců. Nebyla nalezena souvislost mezi Apgar-skore ani pH krve (11, 12).



5. Bylo zjištěno, že u sledovaných pacientů byly nalezeny významné rozdíly mezi hodnotami Dkk-1 v séru podle přítomnosti osteoporózy. Nelze proto vyloučit, že tento parametr by mohl být potenciálním pomocným ukazatelem pro diagnostiku, ev. sledování osob s osteopatiemi (**5, 13**).
6. Ve skupině jedinců s vysokým rizikem MetSy byla zjištěna významně zvýšená koncentrace chemerinu v séru v porovnání s jedinci bez přítomnosti MetSy nebo zdravými jedinci. Byla nalezena významná shoda mezi koncentrací chemerinu v séru a počtem kritérií pro diagnostiku metabolického syndromu. ROC analýzou byla stanovena diagnostická efektivita stanovení sérového chemerinu pro diagnostiku přítomnosti metabolického syndromu. Tyto získané údaje ukazují na vyšší diagnostickou efektivitu stanovení chemerinu v séru než stanovení adiponektinu v séru při diagnostice metabolického syndromu (**9, 14**).
7. Při studii, která byla zaměřena na stanovení PSP-94 jako potenciálního ukazatele maligního onemocnění prostaty bylo zjištěno, že hodnoty PSP-94 souvisely s koncentrací PSA a volným PSA. Osoby po RAPPE měly nejnižší hodnoty PSA, nicméně v hodnotách PSP-94 se testovaní pacienti významně nelišili, i když jedinci po RAPPE měli hodnoty nejnižší. Souvislost mezi Gleasonským skóre a PSP-94 se nepodařilo prokázat (**15**).
8. Při ověření diagnostické efektivity měření koncentrace TFF-1, TFF-2, TFF-3, a Ca-125 v séru u pacientů s podezřením na karcinom endometria, bylo zjištěno, že ženy s karcinomem měly významně zvýšené sérové hodnoty TFF-3. Ve skupině žen s karcinomem endometria nebyl zjištěn významný rozdíl v koncentracích Ca-125, TFF-1, TFF-2 a AIF-1. (**16, 24**).
9. Při ověření diagnostické efektivity měření koncentrace S100A-11, AIF-1 a Ca-125 v séru u žen s podezřením na karcinom endometria, bylo zjištěno, že ženy s karcinomem měly významně zvýšené sérové hodnoty S100A-11. Na základě výsledků bylo, jako ukazatel první volby při diagnostice karcinomu endometria, doporučeno pouze stanovení sérové koncentrace S100A-11 (**24**).

Při interpretaci závěrů je třeba zdůraznit fakt, že exprese genů se často liší od koncentrace jejich produktů v séru, a že řada hypotéz o možném praktickém využití znalosti koncentrace nových molekul na základě znalosti jejich exprese v klinické praxi může selhávat. Je tedy nezbytné odlišit mezi expresí genu (mRNA) a koncentrací jeho produktu v cirkulaci (**8**).

## 7. Vlastní publikace vztahující se k tématu

### Původní vědecké publikace v časopisech s IF

1. Stejskal D, **Švesták M**, Karpíšek M: Stanovení koncentrace osteokrinu v séru novou metodou ELISA. Chem listy 2009; 103: 915-918.
2. Stejskal D, Karpisek M, **Švesták M**, Sporova L, Hejduk P: Pigment Eptelia derived factor as a new marker of metabolic syndrome in Caucasian Population. J Clin Lab Analysis 2010;24:17-19.
3. **Švesták M**, Stejskal D, Sporová L, Hejduk P: Posouzení klinické relevance hodnoty VILIP-1 v séru u pacientů s diagnózou mozkové příhody pomocí vlastní ELISA metody. Chem listy 2011; 105:622-624.
4. Stejskal D, Sporova L, **Švesták M**, Karpisek M, Determination of Serum and Cerebrospinal Fluid Visinin Like Protein 1 Utilized in the Diagnostics of the stroke–A Pilot Study. Biomedical papers 2011; 155: 263-268.
5. **Švesták M**, Karpíšek M, Stejskal D: Stanovení koncentrace Dickkopf-1 proteinu v séru pomocí nové metody ELISA. Chem listy 2012; 106: 27-29.
6. **Svestak M**, Sporova L, Hejduk P, Lacnak B, Stejskal D: Collagenous repeat-containing sentence of 26 kDa protein-newly discovered adipokine sensu lato-minireview, Biomedical papers 2010; 154: 199-202.
7. Stejskal D, Karpíšek M, Humenanská V, Lačnák B, **Švesták M**: Macrophage-inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in differential diagnosis of dyspnea - A pilot study. Clin Biochem 2009; 42:1347-51.
8. Smékal A, Václavík J, Stejskal D, Richterová R, Louis A, Hutyra M, **Švesták M**, Cibulková P, Janýšková H, Táborský M: Determination of adipokine expression in the peripheral blood leukocytes of young patients with myocardial infarction, Clinical Cardiology: Original Article, *v tisku, neindexováno.*

## Původní vědecké publikace v recenzovaných časopisech

9. Stejskal D, Karpisek M, Hanulova Z, **Svestak M**, Petzel M: Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population – A pilot study. Biomed papers 2008; 152: 217-223.

## Seznam publikovaných abstrakt

10. Stejskal D, Sporova L, **Švesták M**, Nekl L, Karpisek M, Kotolova H, Kollar P, Stejskal P, Mares J, Kanovsky P: The determination of serum and Csf VILIP-1 utilized in the diagnosis of stroke. Abstract book of International Conference on Biomarkers and Research 2010;67.
11. **Švesták M**, Humenanská V, Hanulová V, Sporová L, Hejduk P, Kantor L, Seitlová P, Procházková J, Stejskal D: Vývoj diagnostické soupravy na stanovení sekretagoginu a následné ověření jeho stanovení v séru v diagnostice poškození CNS (pilotní studie). Klinická biochemie a metabolismus. Abstrakta kongresu KB 2009; 17:201.
12. Stejskal D, Kantor L, **Švesták M**, Procházková J: Využití stanovení sekretagoginu v neonatologii. Abstrakta X. celostátní sjezd ČSKB Plzeň 2011;179.
13. Stejskal D, Karpisek M, **Svestak M**: Measurement of serum dickkopf-1 protein with the new ELISA – A pilot study. CCLM 2011–abstracts IFCC wordlab Euromedlab Berlin 2011; 172.
14. Sporová L, **Švesták M**, Hejduk P, Stejskal D: Chemerin jako ukazatel metabolického syndromu, vliv chirurgicky indukované menopauzy a HST na jeho sérovou koncentraci. Vnitr Lek 2009; 55: P1-P44.
15. **Švesták M**, Brozová B, Válková Z, Sporová L, Hejduk P, Vidlář A, Stejskal D: PSP 94 jako potenciální ukazatel onemocnění prostaty. Klin Biochem Metab 2010; 2:119.

16. Ondrová D, Stejskal D, Pilka R, **Švesták M**: Parameters trefoils Called Factors in pregnant women. Abstract book of 10 Congress of Royal College of Obstetricians and Gynaecologists 2012; P1.004.
17. Stejskal D, Karpisek M, Hejduk P, Nekl L, Sporova L, **Svestak M**: Serum apolipoprotein H as marker of diabetic nephropathy – A pilot study. Abstracts IFCC wordlab Euromedlab Berlin 2011; 141, P0753.
18. **Švesták M**, Hejduk P, Sporová L, Procházková J, Stejskal D: Osteopontin. Sborník abstrakt imunochemických dnů 2010; 171, P04.
19. Petzel M, **Švesták M**, Hejduk P, Sporová L, Stejskal D: A-FABP, OPG a chirurgicky indukovaná menopauza. Vnitř Lek 2009; 55: P12-P44.
20. **Švesták M**, Stejskal D, Karpíšek M, Novotný D: Využití stanovení sLOX1, pilotní studie. XXX. Imunochemické dny 2009; 176, P5.
21. Stejskal D, **Švesták M**, Seitlová P, Lačňák B, Pucek L: Využití MIC-I v diferenciální diagnostice dušnosti. Sborník abstrakt FONS 2008; 117.
22. Stejskal D, **Švesták M**, Sporová L, Hejduk P: Tuková tkáň jako endokrinní orgán. Klinická biochemie a metabolismus abstrakta kongresu KB 2009; 17:176.
23. Pilka R, Stejskal D, **Svestak, M**, Ondrova D, Neubert D, Huml K: New laboratory markers in the diagnosis of endometrial cancer – the pilot study. IJGC 2013; Abstracts ESGO, 23:1160.
24. Stejskal D, **Svestak M**, Ondrova D, Pilka R: The use of new laboratory markers in the diagnosis of endometrial carcinomas – the pilot study. Biochimica clinica 2013; 37:S411, T239.

25. Zahálková J, Marsová M, Nikorjaková I, **Švesták M**, Žamboch K: Prevalence and relationship between factors related to cardiovascular ossification in dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2011; 26:S364.
  
26. Vaclavik J, Kocianova E, Sedlak R, Plachy M, Navratil K, Plasek J, Jarkovsky J, Vaclavik T, **Svestak M**, Taborsky M: Prediction of response to spironolactone treatment in patients with resistant arterial hypertension: insights from the ASPIRANT trial. *European Heart Journal* 2011; 32:645.

## 8. Literatura

Aikou S, Ohmoto Y, Gunji T et al: Tests for Serum Levels of trefoil factor family proteins can improve gastric cancer screening. *Gastroenterology* 2011; 141:837-45.

Al-azzeH E-d: Gene regulation of the ruman Trefoil Factor Family (TFF) in gastrointestinal Cell lines, Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen2001.

Alexandra A , Sebastian D, Christopher J et al: Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine*. 2012; 42:243-51.

An WF, Bowlby MR, Betty M et al: *Nature* 2000; 403:553-56.

Aronis KN, Sahin-Efe A, Chamberland JP et al: Chemerin Levels as Predictor of Acute Coronary Events: A case–control study nested within the veterans affairs normative aging study. *Metabolism* 2014; S0026-0495:00052-53.

Bahi N, Friocourt G, Carrie A et al: *Hum Mol Genet* 2003; 12:1415-25.

Baus-Loncar M, Al-azzeH E-d, Romanska H et al:Transcriptional control of TFF-3 (intestinal trefoil factor) via promoter binding sites for the nuclear factor B and C/EBP. *Peptides*2004; 25:849-54.

Beauregard M, Gagnon E; Guay-Bélanger S; Siris ES; Morissette J; Brown JP; Michou L. Genetic association study of Dickkopf-1 and sclerostin genes with paget disease of bone. *Calcif Tissue Int*2013; 93:405-12.

Bernstein HG, Braunewell K-H, Spilker C et al: *NeuroReport*2002;23:393-96.

Bignotti E, Ravaggi A, Tassi RA et al: Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *Br J Cancer* 2008;99:768-73.

Blin N: Cytoprotective trefoil peptides abound in new functions. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2907-909.

Bodine P V: *Cell Res*2008;18:248-53.

Bossenmeyer-Pourié C, Kannan R, Ribieras S et al: The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 2002;157:761-70.

Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J et al: Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 2007; 148:4687-94.

Braunewell KH, Brackmann M, Schaupp M et al: *J. Neurochem* 2001;78:1277-86.

Braunewell KH, Gundelfinger ED: *Cell Tissue Res*1999;295:1-12.

Braunewell KH: The visinin-like proteins VILIP-1 and VILIP-3 in Alzheimer's disease-old wine in new bottles.*Front Mol Neurosci.* 2012; 5:20.

Buache E, Etique N, Alpy F, et al: Deficiency in trefoil factor 1 (TFF-1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF-1-knockout mice. *Oncogene* 2001;1-13.

Burgoyne RD, O'Callaghan DW, Hasdemir B et al: *Trends Neurosci* 2004;27:203-209.

Buttgereit J, Qadri F, Monti J et al: Visinin-like protein 1 regulates natriuretic peptide receptor B in the heart. *Regul Pept* 2010; 161:51-57.

Buron N, Guery L, Creuzat-Garcher C et al: Trefoil Factor TFF-1-induced protection of conjunctival cells from apoptosis at premitochondrial and postmitochondrial levels. *Investagative Ophthalmology & Visual Science* 2008; 49:3790-98.

Buttgereit J, Qadri F, Monti J et al: Visinin-like protein 1 regulates natriuretic peptide receptor B in the heart. *Regul Pept* 2010; 161:51-57.

Catalioto RM, Valenti C, Liverani L et al: Characterization of a novel proinflammatory effect mediated by BK and the kinin B<sub>2</sub> receptor in human preadipocytes. *Biochem Pharmacol* 2013; 86:508-20.

Cejka D, Herberth J, Branscum AJ et al: *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6:877-82.

Cooka GA, Familiaria M, Thimb L et al: The trefoil peptides TFF-2 and TFF-3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Letters* 1999; 456:155-59.

Crowe S, Wu LE, Economou C et al: Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity. *Cell Metab*2009;10:40-47.

Crowther JR: *ELISA: Theory and practice*. Humana press Inc., New Jersey 1996).

D'Amelio P, Roato I, D'Amico L et al: Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. *Osteoporos Int* 2011; 22:2869-77.

Dai Z, Zhou T, Li C et al: Intracellular pigment epithelium-derived factor contributes to triglyceride degradation. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:2076-86.

Dardaei L, Shahsavani R, Gnavamzadeh A, et al: The detection of disseminated tumor cells in bone marrow and peripheral blood of gastric cancer patients by multimarker (CEA, CK20, TFF-1 and MUC2) quantitative real-time PCR. *Clinical Biochemistry* 2011;44:325-30.

Dhar DK, Whang TC, Tabara H et al: Expression of Trefoil Factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin Cancer Res*2005; 11:6472-78.

El-Mesallamy HO, El-Derany MO, Hamdy NM: Serum omentin-1 and chemerin levels are interrelated in patients with Type 2 diabetes mellitus with or without ischaemic heart disease. *Diabet Med* 2011; 28:1194-200.

Eisinger K, Bauer S, Schäffler A, Walter R et al: Chemerin induces CCL2 and TLR4 in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Exp Mol Pathol* 2012; 92:90-96.



Espino PS, Li L, He S et al: Chromatin modification of the Trefoil Factor 1 gene in human breast cancer cells by the ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 2006; 66:4610-16.

Executive Summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-97.

Foertsch F, Teichmann N, Kob R et al: S100A11 is involved in the regulation of the stability of cell cycle regulator p21(CIP1/WAF1) in human keratinocyte HaCaT cells. *FEBS J.* 2013;280:3840-53.

Friedecký B, Šprongl L, Kratochvíla J et al: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus* 2011; 1:36-44.

Fueger PT, Chrisler JC, Lu D et al: Trefoil Factor 3 stimulates human and rodent pancreatic islet-cell replication with retention of function. *Molecular Endocrinology* 2008; 22:1251-59.

Garnero P, Tabassi NC, Voorzanger-Rousselot N: Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol* 2008; 35:2313-15.

Garces MF, Sanchez E, Ruiz-Parra A et al: Serum chemerin levels during normal human pregnancy. *Peptides* 2013; 42:138-43.

Garnero P, Tabassi NC, Voorzanger-Rousselot N: Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J. Rheumatol.* 2008; 35:2313-15.

Gattu AK, Birkenfeld AL, Jornayaz F et al: Insulin resistance is associated with elevated serum pigment epithelium-derived factor (PEDF) levels in morbidly obese patients. *Acta Diabetol* 2012; 1:S161-69.

Gierke P, Zhao C, Bernstein H G et al: Implication of neuronal Ca<sup>2+</sup>-sensor protein VILIP-1 in the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Neurobiol Dis* 2008;32:162-75.

Glantschnig H, Hampton RA, Lu P et al: Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo. *J Biol Chem* 2010; 285:40135-47.

Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA et al: Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem* 2007; 282:28175-88.

Gyengesi E, Andrews ZB, Paxinos G et al: Distribution of secretagogin-containing neurons in the basal forebrain of mice, with special reference to the cholinergic corticopetal system. *Brain Res Bull.* 2013; 94:1-8.

Haruhiko O, Makoto TK, Dongfeng T: et al: Frequent trefoil factor 3 (TFF-3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2005;26:369-77.

Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H et al: Serum and cerebrospinal fluid levels of visinin-like protein-1 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev* 2013; S0387-7604:262-263.

Hořejší V, Bartůňková J: *Základy imunologie*. Triton, Praha 2002; 283 str., ISBN 085-2225-01.

Chakaroun R, Raschpichler M, Kloting N et al: Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism* 2011; 61:706-14.

Chalupova L, Zakovska A, Adamcova K.:Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of serum CTRP1: measurement of serum CTRP1 in healthy donors and patients with metabolic syndrome a pilot study. *Clin Biochem* 2013; 46:73-78.

Chamberland JP, Berman RL, Aronis KN et al: Chemerin is expressed mainly in pancreas and liver, is regulated by energy deprivation, and lacks day/night variation in humans. *Eur J Endocrinol* 2013; 169:453-62.

Chen C, Tso AW, Law LS et al:Plazma level of pigment epithelium-derived factor is independently associated with the development of the metabolic syndrome in Chinese men: a 10-year prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:5074 81.

Chen C, Tso AW, Cheung BM et al: Plasma concentration of pigment epithelium-derived factor is closely associated with blood pressure and predicts incident hypertension in Chinese: a 10-year prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76(4):506-13.

Chen H, Jia W, Xu X et al: Upregulation of PEDF expression by PARP inhibition contributes to the decrease in hyperglycemia-induced apoptosis in HUVECs. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369:718-24.

Jialal I, Devaraj S, Kaur H et al: Increased Chemerin and Decreased Omentin-1 in Both Adipose Tissue and Plasma in Nascent Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:E514-17.

Jiang T, Huang L, Zhang S: Dkk-1 in serum as a clinical and prognostic factor in patients with cervical cancer. *Int J Biol Markers* 2013; 28:E221-25.

Jeon JH, Kim KY, Kim J H et al: A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production. *FASEB J* 2008;22:1502-11.

Kalabis J, Rosenberg I, Podolsky D K: Vangl1 protein acts as a downstream effector of intestinal Trefoil Factor (ITF)/TFF-3 signaling and regulates wound healing of intestinal epithelium. *J Biol Chem* 2006;281:6434-41.

Karlíková M, Topolčan O et al: Imunoanalytické metody a jejich využití v biomedicinském výzkumu a klinické praxi. Projekt EE2.3.09.0142, 2009-2012.

Káš J, Kodíček M, Valentová O: Laboratorní techniky biochemie. VŠCHT Praha 2006; ISBN 80-7080-586-2.

Kato S, Matsukura N, Togashi A et al: Sex differences in mucosal response to *Helicobacter pylori* infection in the stomach and variations in interleukin-8, COX-2 and trefoil factor family 1 gene expression. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20:17-24.

Kawada T.: Insulin-related biomarkers to predict the risk of metabolic syndrome. *Int J Endocrinol Metab* 2013; 11(4):e10418.

Ke HZ; Richards WG; Li X; Ominsky MS, Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocr Rev* 2012; 33:747-83.

Katz A, Nambi SS, Mather K et al: Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2402-10.

Kinoshita K, Taupin DR, Itoh H et al: Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal Trefoil Factor. *Mol Cell Biol* 2000;20:4680-90.

Kjellev S: The trefoil factor family – small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:1350 – 1369.

Kosaka K, Kosaka T: Secretagogin-containing neurons in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res.* 2013;77:16-32.

Kouno T, Mizuguchi M, Sakaguchi M et al: The structure of S100A11 fragment explains a local structural change induced by phosphorylation. *J Pept Sci.* 2008; 14:1129-38.

Kouznetsova I, Chwieralski CE, Bälder R et al: Induced Trefoil Factor family 1 expression by trans-differentiating clara cells in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36:286-95.

Lasser G, Guchhait P, Ellsworth JL et al: C1qTNF-related protein-1 (CTRP-1): a vascular wall protein that inhibits collagen-induced platelet aggregation by blocking VWF binding to collagen. *Blood* 2006; 107:423-30.

Laterza OF, Modur VR, Crimmins DL et al: Identification of novel brain biomarkers. *Clin Chem* 2006;52:1713-21.

Laurence M: PSP94, What Is It Good For?. Shipshaw Labs 2013.

Lecke SB, Morsch D, Spritzer PM: Circulating levels and subcutaneous adipose tissue gene expression of pigment epithelium-derived factor in polycystic ovary syndrome and normal women: a case control study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013; 11: 77.

Lemberger SIK, Dorsch R, Hauck SM et al: Decrease of Trefoil factor 2 in cats with feline idiopathic cystitis. *BJU Int* 2010; 107:670-77.

Liu XM, Ding GL, Jiang Y et al: Down-regulation of S100A11, a calcium-binding protein, in human endometrium may cause reproductive failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:3672-83.

Liu X, Chen HH, Zhang LW: Potential therapeutic effects of pigment epithelium-derived factor for treatment of diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol* 2013; 6:221-27.

Liu Y, Huo X, Pang X F et al: Musclin inhibits insulin activation of Akt/protein kinase B in rat skeletal muscle. *J Int Med Res* 2008; 36:496-504.

Liu Y, Long L, Wang S Yet al: Circulating Dickkopf-1 and osteoprotegerin in patients with early and longstanding rheumatoid arthritis. *Chin Med J* 2010; 123:1407-12.

Long L, Liu Y, Wang S et al: Dickkopf-1 as potential biomarker to evaluate bone erosion in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2010; 30:669-75.

Lukáš Z, Dráberová E, Feit et al: Imunohistochemické metody v biologii a v biotické diagnostice. Masarykova univerzita Brno 1997; 170 str., ISBN 80-210-0620-X.

Luo X, Hou L, Shi H et al: CSF levels of the neuronal injury biomarker visinin-like protein-1 in Alzheimers disease and dementia with Lewy bodies. *J Neurochem* 2013; 127:681-90.

MacDougald OA, Burant CF: The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metabolism* 2007; 6:159-61.

Madsen J, Nielsen, Tornoe I et al: Tissue localization of human Trefoil Factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem* 2007; 55:505-13.

Maj M, Milenkovic I, Bauer J et al: Novel insights into the distribution and functional aspects of the calcium binding protein sekretagoin from studies on rat brain and primary neuronal cell culture. *Front Mol Neurosci* 2012; 5:84.

Makino E, Sakaguchi M, Iwatsuki K, Huh NH. Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death. *J Mol Med (Berl)* 2004; 82:612-20.

Mančal P: Metody enzymové imunoanalýzy. Ústav sér a očkovacích látek, Praha 1987.

Matsui T, Higashimoto Y, Yamagishi S: Laminin receptor mediates anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of pigment epithelium-derived factor in myeloma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 443(3):847-51.

Matsuzawa Y: Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3:35-42.

Michael J, Marshall MJ, Evans SF, Sharp Ch et al: Increased circulating Dickkopf-1 in Pagets disease of bone. *Clin Biochem* 2009; 42:965-69.

Moffatt P, Thomas G, Sellin K, Bessette et al: Osteocrin is specific ligand of the natriuretic peptide clearance receptor that modulates bone growth. *J Biol Chem* 2007; 282:36454-62.

Moreno-Navarrete JM, Touskova V, Sabater M et al: Liver, but not adipose tissue PEDF gene expression is associated with insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37:1230-37.

Motovska Z, Vichova T, Tousek P et al: Circulating osteoprotegerin and Dickkopf-1 changed significantly after surgical aortic valve replacement but remained without any significant differences after transcatheter aortic valve implantation. *Int J Cardiol* 2012; 158:300-01.

Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H et al: Serum levels of pigment epithelium-derived factor (PEDF) are an independent determinant of insulin resistance in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol*. 2010;143(1):96-98.

Neuparth MJ, Proença JB, Santos-Silva A et al: The Positive Effect of Moderate Walking Exercise on Chemerin Levels in Portuguese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Investig Med* 2014; 62:350-53.

Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y et al: Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem* 2004; 279:19391-95.

Oertel M, Graness A, Thim L et al: Trefoil Factor Family – peptides promote migration of human bronchial epithelial cells synergistic effect with epidermal growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:418-24.

Oh H, Chun Ch, Chun JS: Dkk-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis Rheum* 2012; 64:2568-78.

Ouwens DM, Bekaert M, Lapauw B et al: Chemerin as biomarker for insulin sensitivity in males without typical characteristics of metabolic syndrome. *Arch Physiol Biochem* 2012; 118:135-38.

Pathak BR, Breed AA, Nakhawa VH, Jagtap DD, Mahale SD. Growth inhibition mediated by PSP94 or CRISP-3 is prostate cancer cell line specific. *Asian J Androl* 2010; 12:677-89.

Paulsen F P, Wonn C-W, Varoga D et al: Intestinal Trefoil Factor/TFF-3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. *J Biol Chem* 2008;283:13418-27.

Paulsen FP, Hinz M, Schaudig U et al: TFF peptides in the human efferent tear ducts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:3359-64.

Pećina-Slaus N: Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. *Cancer Cell Int* 2010; 10:22.

Pera M, Heppell J, Poulosom R et al:Ulcer associated cell lineage glands expressing trefoil peptide genes are induced by chronic ulceration in ileal pouch mucosa. *Gut* 2001; 48:792-96.

Perry JK, Kannan N, Grandison PM et al:Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:74-81.

Pfau D, Bachmann A, Lössner U et al: Serum levels of the adipokine chemerin in relation to renal function. *Diabetes Care* 2010; 33:171-73.

Poppel MN, Zeck W, Ulrich D et al: Cord blood chemerin: differential effects of gestational diabetes mellitus and maternal obesity. *Clin Endocrinol* 2014; 80:65-72.

Poulsen SS, Thulesen J, Nexø E, Thim L: Distribution and metabolism of intravenously administered trefoil factor 2/porcine spasmolytik polypeptide in the rat. *Gut* 1998;43:240-47.

Prest SJ, May F EB, Westley B: The estrogen-regulated protein, TFF-1, stimulates migration of human breast cancer cells. *The FASEB Journal* 2002; 16:392-94.

Puthussery T, Gayet-Primo J, Taylor WR et al: Immunohistochemical identification and synaptic inputs to the diffuse bipolar cell type DB1 in macaque retina. *J Comp Neurol* 2011; 519:3640-56.

Rabia H: Multiplex immunoassay in clinical bioanalysis: the promise and challenges to implementation in clinical development. *Life Science* 2010; 37: 1-4.

Rubenstein K: Multiplex Assays: Evolving Technologies, Applications and Future Directions Report - Overview. *Pharma* 2010.

Register TC, Hruska KA, Divers J et al: Plasma Dickkopf1 (DKK1) concentrations negatively associate with atherosclerotic calcified plaque in African-Americans with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(1):E60-5.

Rehman I, Azzouzi AR, Cross SS et al: Dysregulated expression of S100A11 (calgizzarin) in prostate cancer and precursor lesions. *Hum Pathol* 2004; 35:1385-91.

Ren RZ, Zhang X, Xu J et al: Chronic ethanol consumption increases the levels of chemerin in the serum and adipose tissue of humans and rats. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33:652-59.

Ress C, Tschoner A, Engl J et al: Effect of bariatric surgery on circulating chemerin levels. *Eur J Clin Invest* 2010; 40:277-80.

Rodrigues S, Attoub S, Nguyen QD et al: Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 2003;22: 4488-97.

Rogstam A, Linse S, Lindqvist A et al: Binding of calcium ions and SNAP-25 to the hexa EF-hand protein secretagoin. *Biochem J* 2007; 401:353-363.

Roh S, Song SH, Choi KC et al: Chemerin—A new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362:1013-18.



Roman AA, Parlee SD, Sinal CJ: Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine* 2012; 42(2):243-51.

Ruchaud-Sparagano MH, Westley BR, May F EB: The trefoil protein TFF-1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1946–54.

Samson MH, Nexo E: Validation of commercial assays for measurements of trefoil factor family peptides in serum. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:2057-60.

Samson MH, Vestergaardb EM, Milmanc N et al: Circulating serum trefoil factors increase dramatically during pregnancy the scandinavian. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68:369-74.

Saremi A, Asghari M, Ghorbani A: Effects of aerobic training on serum omentin-1 and cardiometabolic risk factors in overweight and obese men. *J Sports Sci* 2010; 28:993-98.

Saremi A, Shavandi N, Parastesh M et al: Twelve-week aerobic training decreases chemerin level and improves cardiometabolic risk factors in overweight and obese men. *Asian J Sports Med* 2010; 1:151-58.

Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y: Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system: physiological distribution and pathological significance. *Prog Histochem Cytochem* 2007;42:61-110.

Sell H, Divoux A, Poitou C et al: Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:2892-96.

Sell H, Laurencikiene J, Taube A et al: Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 2009; 58:2731-40.

Shi LS, Gang H, Bin Y et al: Clinical Significance and Prognostic Value of Serum Dickkopf-1 Concentrations in Patients with Lung Cancer. *Clin Chem* 2009; 55:1656-64.

Shukeir N, Arakelian A, Gaoping Ch et al: A synthetic 15-mer Peptide (PCK3145) derived from prostate secretory protein can reduce tumor growth, experimental skeletal metastases, and malignancy-associated hypercalcemia. *Cancer Res* 2004;64:5370-77.

Stepan H, Philipp A, Roth I et al: Serum levels of the adipokine chemerin are increased in preeclampsia during and 6 months after pregnancy. *Regul Pept* 2011; 168:69-72.

Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky D K: Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: Tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:11017-21.

Sun Z, Wang C, Shi C et al: Activated Wnt signaling induces myofibroblast differentiation of mesenchymal stem cells, contributing to pulmonary fibrosis. *Int J Mol Med* 2014; 33(5):1097-109.

Sunderland KL, Tryggestad JB, Wang JJ et al: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) varies with body composition and insulin resistance in healthy young people. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E2114-18.

Tahara N, Yamagishi S, Tahara A et al: Serum levels of pigment epithelium-derived factor, a novel marker of insulin resistance, are independently associated with fasting apolipoprotein B48 levels in humans. *Clin Biochem* 2012; 45:16-17.

Takanori M, Yuri N, Ayako O et al: Pigment Epithelium-Derived Factor Improves Metabolic Derangements and Ameliorates Dysregulation of Adipocytokines in Obese Type 2 Diabetic Rats. *The American Journal of Pathology* 2014;184:1094-1103.

Tan XD, Chen YH, Liu QP et al: Prostanoids mediate the protective effect of trefoil factor 3 in oxidant-induced intestinal epithelial cell injury: role of cyclooxygenase-2. *J Cell Sci* 2000;113:2149-55.

Tanaka M, Adzuma K, Iwami M et al: Human calgizzarin; one colorectal cancer-related gene selected by a large scale random cDNA sequencing and northern blot analysis. *Cancer Lett* 89 1995; 195-200.

Tarawneh R, Lee JM, Ladenson JH et al: CSF VILIP-1 predicts rates of cognitive decline in early Alzheimer disease. *Neurology* 2012; 78:709-19.

Terawaki H, Yamagishi S, Funakoshi Y et al: Pigment epithelium-derived factor as a new predictor of mortality among chronic kidney disease patients treated with hemodialysis. *Ther Apher Dial* 2013;17:625-30.

Thima L, May F EB: Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Scie* 2005;62:2956-73.

Thomas L et al: *Clinical Laboratory Diagnostics: use and assessment of clinical laboratory result*. TH-Books 1998; ISBN 3-9805215-4-0.

Thomas G, Moffatt P, Salois P et al: Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype. *J Biol Chem* 2003;278:50563-71.

Thuny F, Textoris J, Amara AB, Filali AE, Capo C, Habib G, Raoult D, Mege JL. The gene expression analysis of blood reveals S100A11 and AQP9 as potential biomarkers of infective endocarditis. *PLoS One* 2012; 7:e31490.

Tiang T, Wang S, Huang L et al: *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19:1177-81.

Tönjes A, Fasshauer M, Kratzsch J et al: Adipokine pattern in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in comparison to normal glucose tolerance and diabetes. *PLoS One* 2010; 5:e13911.

Tong XM, Lin XN, Song T et al: Calcium-binding protein S100P is highly expressed during the implantation window in human endometrium. *Fertil Steril*. 2010;94:1510-8.

Tschoner A, Sturm W, Röss C et al: Effect of weight loss on serum pigment epithelium-derived factor levels. *J Eur Clin Invest* 2011; 41:937-42.

Vestergaard E M, Brynskov J, Ejlskjær K et al: Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory disease. *Scan J Lab Invest* 2004; 64:146 –56.

Vestergaard EM, Poulsen SS, Gronbæk H et al: Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3. *Clin Chem* 2002;48:1689–95.

Voorzanger-Rousselot N, Journe F, Doriath V et al.: Assessment of circulating Dickkopf-1 with a new two-site immunoassay in healthy subjects and women with breast cancer and bone metastases. *Calcif Tissue Int* 2009; 84:348-54.

Wang P, Smit E, Brouwers M et al: Plasma pigment epithelium-derived factor is positively associated with obesity in Caucasian subjects, in particular with the visceral fat depot. *Eur J Endocrinol* 2008; 159:713-18.

Wang L, Hu XB, Zhang W et al: Dickkopf-1 as a novel predictor is associated with risk stratification by GRACE risk scores for predictive value in patients with acute coronary syndrome: a retrospective research. *PLoS One* 2013; 8:e54731.

Wang JJ, Zhang SX, Mott R et al: Salutary effect of pigment epithelium-derived factor in diabetic nephropathy: evidence for antifibrogenic activities. *Diabetes* 2006; 55:1678-85.

Wang SH, Liang CJ, Wu JC et al: Pigment epithelium-derived factor reduces the PDGF-induced migration and proliferation of human aortic smooth muscle cells through PPAR $\gamma$  activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44:280-89.

Weltzien F, Dimarco S, Protti DA et al: Characterization of secretagogin-immunoreactive amacrine cells in marmoset retina. *J Comp Neurol*. 2014; 522:435-55.

Wild D et al: *The Immunoassay Handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*. Elsevier Science 2013; Edition number: 4, ISBN-13: 9780080970370.

Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M et al: Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* 2003; 198:977-85.

Xue H, Lü B, Zhang J et al: Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. *J Proteome Res* 2010;9:545-55.

Yamamoto T, Qureshi AR, Anderstam B et al: Clinical importance of an elevated circulating chemerin level in incident dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:4017-23.

Yamagishi S, Adachi H, Abe A et al: Elevated serum levels of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:2447-50.

Yamagishi S, Matsui T: Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF) and Cardiometabolic Disorders. *Curr Pharm Des* 2014; 20(14):2377-86.

Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T et al: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits advanced glycation end product-induced retinal vascular hyperpermeability by blocking reactive oxygen species-mediated vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *J Biol Chem* 2006; 281:20213-20.

Yang S, Lv Q, Luo T, Liu L, et al: Metformin Inhibits Expression and Secretion of PEDF in Adipocyte and Hepatocyte via Promoting AMPK Phosphorylation. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:429207.

Yasui A, Nishizawa H, Okuno Y: Foxo1 represses expression of musclin, a skeletal muscle-derived secretory factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364:358-65.

Yilmaz Y, Eren F, Ayyildiz T et al: Serum pigment epithelium-derived factor levels are increased in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease and independently associated with liver steatosis. *Clin Chim Acta* 2011; 412:2296-99.

Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R et al: Serum levels of omentin, chemerin and adipsin in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46:91-97.

Zabel B A, Zuniga L, Ohyama T et al: Regulation of Chemerin Bioactivity by Plasma Carboxypeptidase N, Carboxypeptidase B (Activated Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor), and Platelets. *Exp. Hematol* 2006; 34:1021-1032.

Yilmaz Y, Kurt R, Gurdal A et al: Circulating vaspin levels and epicardial adipose tissue thickness are associated with impaired coronary flow reserve in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2011; 217:125-29.

Yu K, Jiang S F, Lin M F et al: Extraction and purification of biologically active intestinal trefoil factor from human meconium. *Lab Invest* 2004; 84:390-92.

Zhang Y, Yu G, Xiang Y et al: Bm-TFF-2, a toad trefoil factor, promotes cell migration, survival and wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398:559-64.

Zhao W, Gao H, Zhu J-X et al: Relation of serum Dickkopf-1 with bone destruction in patients with gouty arthritis. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2012; 44:254-58.

Zurek J, Fedora M: The usefulness of S100B, NSE, GFAP, NF-H, secretagogin and Hsp70 as a predictive biomarker of outcome in children with traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien)* 2012; 154:93-103.

Zurek J, Kýr M, Vavřina M et al: Trefoil factor 2 expression and its significance as a predictor of severity of sepsis in children. *Peptides* 2013; 46:1-5.

Žurek J, Fedora M: Trefoil factor 1 as a marker of mucosal damage of the gastrointestinal tract in children with sepsis. *Biomarkers* 2013; 18:338-42.