

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Martina Peštová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 (FGF 23) A JEHO
VÝZNAM PRO ONKOLOGICKOU PRAXI.**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

PLZEŇ 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 3. 2018.

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce docentu PharmDr. Radku Kučerovi, Ph.D. za pomoc s výběrem tématu, koncepcí bakalářské práce a vysvětlením úskalí vyhodnocení výsledků. Dále bych chtěla poděkovat primáři Oddělení imunochemické diagnostiky, FN Plzeň, profesoru MUDr. Ondřeji Topolčanovi, Ph.D. za klinickou interpretaci výsledků a připomínky týkající se hodnocení kvality laboratorní práce. V neposlední řadě děkuji svým kolegyním Oddělení imunochemické diagnostiky za pomoc během laboratorní práce.

Anotace

Příjmení a jméno: Martina Peštová

Katedra: Katedra záchrannářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Fibroblast growth factor 23 (FGF 23) a jeho význam pro onkologickou praxi

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

Počet stran – číslované: 67

Počet stran – nečíslované: 24

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 43

Klíčová slova: FGF 23, kolorektální karcinom, jaterní metastázy kolorektálního karcinomu, LIASON, CLIA

Souhrn:

Tato bakalářská práce zabývá novým nádorovým markerem Fibroblastovým růstovým faktorem (FGF 23) a jeho možným uplatněním v diagnostice kolorektálního karcinomu a jeho jaterních metastáz. Cílem bylo zavedení metody CLIA (Sandwich Chemiluminescent Immunoassay) na přístroji LIASON XL firmy DiaSorin pro stanovení FGF 23, provést stanovení markeru FGF 23 u probandů normální populace pro získání normálních referenčních hodnot a stanovení u pacientů s kolorektálním karcinomem a pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu. Vyhodnocení zahrnovalo porovnání hladin v jednotlivých skupinách a porovnání s již zavedenými markery, CA 19-9, TPA a TPS jejichž hladiny byly stanoveny u stejných skupin. Po zavedení stanovení FGF 23 metodou CLIA byly referenční hodnoty FGF 23 pro vzorek zdravé populace stanoveny na 30 – 105 pg/mL. Hodnoty FGF 23 pacientů s kolorektálním karcinomem stadia IV a metastázami do jater před operací a po operaci ukázaly statisticky signifikantní pokles. Hodnoty FGF 23 s žádným jiným stanovovaným markerem nekorelovaly. FGF 23 podle našich výsledků zatím není vhodný jako nádorový marker pro klinickou praxi, jeho stanovení je možno využít pro studium etiopatogeneze nádorového onemocnění.

Annotation

Surname and name: Martina Peštová

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Fibroblast Growth Factor 23 (FGF 23) and Their Importance to Oncological Practice

Consultant: Doc. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

Number of pages – numbered: 67

Number of pages – unnumbered: 24

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 43

Keywords: FGF 23, colorectal carcinoma, colorectal liver metastases, LIASON, CLIA

Summary: This bachelor thesis is focused on the new tumor marker Fibroblast Growth Factor 23 (FGF 23) and its possible application in the diagnosis of colorectal carcinoma and its liver metastases. The goal of this thesis was to introduce the new automated chemiluminescent immunoassay (CLIA) method on the DiaSorin LIASON XL instrument to the determination of FGF 23. The main purpose of the FGF 23 introducing was to assess the level of FGF 23 in the normal population to obtain reference values and to assess level of FGF 23 in colorectal cancer patients and patients with the colorectal origin liver metastases. The evaluation included the comparison of the levels in the individual groups and comparison with already established tumor markers CEA, CA 19-9, TPA and TPS whose levels were determined in the same groups. According to the results of the FGF 23 assay by the CLIA method, FGF 23 reference values for the healthy population were set up at 30-105 pg/mL. In patients with colorectal cancer, the level of FGF23 vary with the stage of the disease. In early stages is the level higher than in advanced stages with the liver metastases. The levels of FGF 23 in patients with the stage IV of colorectal cancer before surgery were statistically significantly higher than the levels after surgery. FGF 23 levels did not correlate with any other marker. FGF 23 is not yet usable as a tumor marker in clinical practice, its use can be used for the study of tumor disease etiopathogenesis.

OBSAH

ÚVOD.....	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM	12
1.1 Rizikové faktory pro vzniku kolorektálního karcinomu.....	12
1.1.1 Životní styl.....	12
1.1.2 Věk	12
1.1.3 Faktory genetické	12
1.1.4 Zánětlivá onemocnění.....	13
1.1.5 Faktory související s předchozí léčbou - radioterapie	13
1.2 Onemocnění a s nimi spojené skupiny osob v riziku.....	13
1.3 TNM klasifikace u nádorů kolorekta	13
1.3.1 pTNM patologická klasifikace nádorového onemocnění.....	15
1.3.2 Rozdělení onemocnění do stadií.....	16
2 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ	18
2.1 Obecná definice nádoru	18
2.2 Získané vlastnosti maligní nádorové tkáně podle Roberta A. Weinberga a Douglase Hanahana	18
2.2.1 Soběstačnost nádorové tkáně v produkci růstových signálů	18
2.2.2 Necitlivost nádorových buněk k signálům zastavujícím postup buněčným cyklem	18
2.2.3 Zabránění vstupu do apoptózy.....	19
2.2.4 Neomezený replikační potenciál buněk.....	20
2.2.5 Posílení angiogeneze nádorovou tkání	20
2.2.6 Tvorba vzdálených ložisek - metastáz.....	21
2.2.7 Nestabilita genomu	21
2.3 Deregulované geny v nádorových buňkách - onkogeny a tumorsupresory.....	21
2.3.1 Protoonkogeny a onkogeny	21
2.3.2 Tumorsupresorové geny	21
3 NÁDOROVÉ MARKERY	23
3.1 Obecná charakteristika nádorových markerů.....	23
3.2 Definice a rozdělení nádorových markeru	23
3.2.1 Onkofetální antigeny	26
3.2.2 Cytokeratinové biomarkery	26
3.2.3 Enzymatické nádorové markery	27
3.2.4 Adhezivní molekuly	27
3.2.5 Blíže nespecifikované látky.....	28

3.2.6	Nádorové markery využívané v diagnostice a léčbě karcinomu kolorekta...	28
3.2.7	Karcinoembryonální antigen (CEA).....	28
3.2.8	Nádorový antigen CA 19-9.....	29
3.2.9	Tkáňový polypeptidický antigen (TPA).....	29
3.2.10	Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS).....	29
3.2.11	Fibroblast growth factor 23 (FGF 23).....	30
4	METODY STANOVENÍ BIOMARKERŮ	32
4.1	Principy analytických metod založených na reakci antigen-protilátka.....	32
4.1.1	Imunoradiometrická analýza (IRMA).....	32
4.1.2	Sandwich Chemiluminescent Immunoassay (CLIA).....	34
	PRAKTICKÁ ČÁST	36
5	CÍL PRÁCE.....	36
5.1	Metodika	36
5.2	Výzkumné otázky	36
6	PRACOVNÍ POSTUP	37
6.1	Sběr a příprava souboru vzorků plazmy + preanalytika	37
6.2	Stanovení markeru FGF 23 – analýza na přístroji LIAISON® XL.....	38
6.3	Kontrola kvality	42
6.3.1	Kontrola stanovení - laboratorní.....	43
6.3.2	Lékařská kontrola	43
6.3.3	Interpretace výsledků.....	43
6.4	Charakteristika kontrolní skupiny a skupiny pacientů.....	45
6.4.1	Charakteristika kontrolní skupiny	45
6.4.2	Charakteristika souboru nemocných	45
6.5	Použité statistické metody	46
7	VÝSLEDKY	47
7.1	Hladiny markeru FGF 23 v plazmě u 366 probandů kontrolní skupiny.....	47
7.2	Hladiny markeru FGF 23 v plazmě pacientů s kolorektálním karcinomem.....	52
7.3	Hladiny markeru FGF 23 v plazmě pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu.....	55
8	DISKUZE	60
8.1	Referenční rozmezí FGF-23	60
8.2	Porovnání hladin FGF-23 kontrolní skupiny a pacientů v různých stadiích onemocnění kolorektálním karcinomem	60
8.3	Porovnání hladin FGF 23 a rutinně používaných nádorových markerů.....	62
9	ZÁVĚRY	66
10	ZÁVĚRY PRO PRAXI	67
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ.....	68

SEZNAM ZKRATEK	74
SEZNAM TABULEK	77
SEZNAM OBRÁZKŮ	79
SEZNAM GRAFŮ	80
SEZNAM PŘÍLOH	81

ÚVOD

Během posledních 15-ti let došlo k výraznému pokroku v diagnostice a zejména léčebných možnostech většiny onkologických onemocnění. Výsledky výzkumu posledních dekád se u řady lokalizací promítly do časnější a přesnější diagnostiky, většího počtu léčebných modalit a celkově úspěšnější léčby, což se projevuje v setrvalém poklesu úmrtnosti na řadu onkologických onemocnění. To je zásadní, uvědomíme-li si že, onkologická onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí 5. až 6. dekády života, navíc incidence nádorových onemocnění stoupá meziročně v průměru o 4%. Mezi onemocnění u kterých došlo k výraznému pokroku v diagnostice a léčebných možnostech, patří také kolorektální karcinom.

Kolorektální karcinom je v České republice jedním z nejčastějších onkologických onemocnění a Česká republika je v jeho incidenci celosvětově na předních pozicích. Podle dat z Národního onkologického registru (NOR) bylo v roce 2004 hlášeno 8064 nových onemocnění kolorektálním karcinomem. V roce 2012 to bylo již 8160 nových onemocnění. Avšak srovnáním úmrtnosti na toto onemocnění stejných let, registrujeme pokles ze 4556 na 3434 případů. Zároveň došlo k prodloužení celkového přežití u metastatické nemoci tohoto onemocnění z 10 na 30 měsíců (Ferlay, 2015). Úspěšnost léčby by jistě byla ještě větší, pokud bychom dokázali diagnostikovat více případů v nižších klinických stádiích a dříve diagnostikovat případné recidivy onkologických onemocnění. V této oblasti mají nezastupitelnou roli nádorové markery.

Nádorové markery dnes patří ke standardním diagnostickým prostředkům. Uplatňují se především v monitorování průběhu onemocnění a ke kontrole úspěšnosti léčby a u některých onemocnění k časně diagnostice. Ve snaze zvýšit sensitivitu nádorových markerů se často analyzuje panel několika markerů současně. Nalézání nových biomarkerů a sledování chování jejich hladin v průběhu onkologických onemocnění umožňuje rozšiřovat stanovované panely markerů a hledat nejvhodnější kombinace pro zodpovězení konkrétní klinické otázky.

Právě novým nádorovým markerem a jeho možným uplatněním v léčbě kolorektálního karcinomu a jeho metastáz se zabývá tato bakalářská práce. Jejím cílem bylo provést stanovení markeru, Fibroblastového růstového faktoru (FGF 23), u pacientů s kolorektálním karcinomem, pacientů s metastázami v játrech a u kontrolní skupiny a porovnání jednotlivých hladin.

TEORETICKÁ ČÁST

1 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Kolorektální karcinom (KRK) je třetím nejčastějším nádorem u mužů a druhým nejčastějším u žen. Celosvětově zahrnuje 10% všech nádorů (Siegel, 2011). Kolorektální karcinom zároveň patří mezi nejčastější onkologická onemocnění ve vyspělých státech a počet nově diagnostikovaných nemocných narůstá. Podle nejnovějších dat GLOBOCAN z roku 2012 (Ferlay, 2013) je česká populace mužů v evropském měřítku na 3. místě, ženská populace na 10. místě. V roce 2014 byla incidence KRK v ČR 79,09/100 000 obyvatel a mortalita 38,15/ 100 000 obyvatel. V roce 2014 bylo diagnostikováno 8160 nových nemocných s kolorektálním karcinom. Přestože incidence stagnuje či mírně stoupá, mortalita pozvolna klesá. (ÚZIS ČR, 2016)

1.1 Rizikové faktory pro vzniku kolorektálního karcinomu

Riziko vzniku kolorektálního karcinomu závisí na řadě faktorů lze je rozdělit na faktory ovlivnitelné a faktory genetické.

1.1.1 Životní styl

Tzv. západní styl života řadíme mezi faktory ovlivnitelné (Johnson, 2013). Zřejmý vliv na rozvoj kolorektálního karcinomu má obezita, nízká fyzická aktivita, nepřiměřený příjem červeného masa, živočišných tuků, uzenin, nepřiměřená konzumace alkoholu, kouření. Bylo definováno 5 základních pilířů zdravého životního stylu v souvislosti se vznikem kolorektálního karcinomu a to zdravá hmotnost, dostatečná fyzická aktivita, nekuřáctví, omezená konzumace alkoholu, zdravá strava. (Aleksandrova, 2014)

1.1.2 Věk

Jasným rizikovým faktorem sporadického KRK je věk. U pacientů ve věku nad 65 let je výskyt téměř v 70%, zatímco u pacientů před 40. rokem je výskyt vzácný. (Davis, 2011)

1.1.3 Faktory genetické

Důležitou morfológickou změnou střevního epitelu při vzniku karcinomu je dysplastická léze epitelu tlustého střeva (polypózní adenom, neadenomové polypy jakékoli etiologie). Riziko následného vzniku karcinomu závisí na histologické stavbě a velikosti léze. Přibližně 20% případů KRK je spojeno s rodinným výskytem v pokrevním

příbuzenstvu 1. stupně (u rodičů, sourozenců a dětí) bez zřejmé autozomálně dominantní dědičnosti (Quintero, 2016). Asi 10% případů KRK jsou hereditární syndromy, s autozomálně dominantní dědičností. Nejčastější hereditární syndrom je Lynchův syndrom, zahrnující kolem 4% všech kolorektálních nádorů. Další časté hereditární syndromy jsou Familiární adenomatózní polypóza (FAP), Peutz-Jeghersův syndrom, Gardnerův syndrom, Turcotův syndrom a Juvenilní polypóza (Hennink, 2015; Jablonská, 2000).

1.1.4 Zánětlivá onemocnění

Dalším predispozičním faktorem pro vznik KRK jsou idiopatické střevní záněty zejména ulcerózní kolitita a Crohnova nemoc (Jablonská, 2000).

1.1.5 Faktory související s předchozí léčbou - radioterapie

Ve vyšším riziku gastrointestinálních malignit jsou pacienti po prodělané onkologické léčbě, konkrétně radioterapii pro malignitu v dětském v oblasti dutiny břišní věku. V dospělosti po radioterapii pro karcinom prostaty se zvyšuje riziko karcinomu rekta (Rapiti, 2008).

1.2 Onemocnění a s nimi spojené skupiny osob v riziku

Na základě výše zmíněných rizikových faktorů byla definována skupina osob se zvýšeným rizikem vzniku KRK. Tyto osoby by měly být zařazeny do pravidelného screeningového programu. Jsou to osoby, u kterých jsou diagnostikovány: (a) adenomové polypy, kolorektální karcinom, zánětlivé onemocnění střev (b) v rodinná anamnéze se nachází KRK nebo jsou diagnostikovány polypů (c) dědičné syndromy (Lynchův syndrom, FAP, Peutz-Jeghersův syndrom), (Schmoll, 2012; Balmaña, 2013).

1.3 TNM klasifikace u nádorů kolorekta

Ke klasifikaci stupně rozvoje onkologického onemocnění se používá TNM klasifikace, ze které vychází chirurgická i onkologická léčba. Kritéria pro zařazení pacienta v TNM klasifikaci jsou uvedena v Tabulkách 1-4 (Edge, 2010; Holubec, 2004).

Tabulka 1: Regionální mízní uzliny pro danou anatomickou lokalizaci, resp. její část

Anatomická lokalizace	Mízní uzliny
Cékum	ileokolické, pravostranné kolické
colon ascendens	ileokolické, pravostranné kolické, střední kolické
flexura hepatica	střední kolické, pravostranné kolické
colon transversum	pravostranné kolické, střední kolické, levostranné kolické, dolní mezenterické
flexura lienalis	střední kolické, levostranné kolické, dolní mezenterické
colon descendens	levostranné kolické, dolní mezenterické
colon sigmoideum	sigmoideální, levostranné kolické, horní rektální (hemoroidální), dolní mezenterické a rektosigmoideální
Rectum	horní, střední a dolní rektální (hemoroidální), dolní mezenterické, vnitřní ilické, mezorektální (pararektální), laterální sakrální, presakrální a sakrální promontoriální (Gerotovy)
	Metastázy v uzlinách jiných než výše uvedených se klasifikují jako metastázy vzdálené.

Tabulka 2: T - rozsah primárního nádoru

T-primární nádor	Rozsah tumoru
TX	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru
Tis	karcinom situ: intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae
T1	nádor postihuje submukózu
T2	nádor postihuje tunica muscularis propria
T3	nádor postihuje subserózu nebo se šíří do neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáně
T4	nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury a/nebo prorůstá na viscerální peritoneum
T4a	nádor prorůstá na viscerální peritoneum
T4b	nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury

Tabulka 3: N- rozsah postižení regionálních mízních uzlin

N- regionální mízní uzliny	Rozsah postižení uzlin
NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
NO	regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	metastázy v 1 až 3 regionálních mízních uzlinách
N1a	metastáza v 1 regionální mízní uzlině
N1b	metastáza ve 2–3 regionálních mízních uzlinách
N1c	ložisko (ložiska) nádoru, tj. satelity
N2	metastázy ve 4 nebo více regionálních mízních uzlinách
N2a	metastázy ve 4–6 regionálních mízních uzlinách
N2b	metastázy ve 4–6 regionálních mízních uzlinách

Tabulka 4: M- přítomnost metastáz

M- vzdálené metastázy	Přítomnost metastáz
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
MO	bez vzdálených metastáz
M1	vzdálené metastázy
M1a	metastázy omezené na jeden orgán (játra, plíce, vaječník, ne-regionální mízní uzlina (uzliny))
M1b	metastázy ve více než jednom orgánu nebo na peritoneu

1.3.1 pTNM patologická klasifikace nádorového onemocnění

Histologické vyšetření patologem vzorků z regionální lymfadenektomie má zahrnovat 12 a více mízních uzlin. Jsou-li mízní uzliny negativní, ale nebylo možno dosáhnout standardně vyšetřovaného počtu, klasifikuje se vyšetření jako pNO (Holubec, 2004).

1.3.2 Rozdělení onemocnění do stadií

Zařazení pacienta do odpovídajícího stádia onemocnění umožňuje indikovat odpovídající onkologickou léčbu. Rozdělení onemocnění do stadií na základě TNM klasifikace uvádí Tabulka 5. (Holubec, 2004; Povýšil, 2007)

Tabulka 5: Rozdělení onemocnění do stadií na základě TNM klasifikace

Stadium	Primární nádor	Regionální mízní uzliny	Vzdálené metastázy
Stadium 0	Tis	N0	
Stadium I	T1,T2	N0	
Stadium II	T3,T4	N0	
Stadium IIA	T3	N0	MO
Stadium IIB	T4a	N0	MO
Stadium IIC	T4b	N0	MO
Stadium III	xT	N1,N2	MO
Stadium IIIA	T1,T2	N1	MO
	T1	N2a	MO
	T1,T2	N2b	MO
Stadium IIIB	T3,T4a	N1	MO
	T2,T3	N2a	MO
	T1,T2	N2b	MO
Stadium IIIC	T4a	N2a	MO
	T3,T4a	N2b	MO

	T4b	N1,N2	MO
Stadium IVA	xT	xN	M1a
Stadium IVB	xT	xN	M1b

x-jakékoliv

2 PATOGENEZE NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

2.1 Obecná definice nádoru

Nádor je nová abnormální tkáň, která nemá fyziologickou funkci a roste neregulovaným způsobem. Maligní nádor je tkáň, která roste invazivně do okolí, infiltruje okolní tkáň a metastazuje. Aby byla nádorová tkáň schopna infiltrativního růstu a metastazování, postupně získává vlastnosti, které definoval Wienberg a Hanahan ve svém článku v roce 2000, v roce 2011 tyto základní vlastnosti dále rozšířili. Nádorová tkáň získává soběstačnost v produkci růstových signálů, nesenzitivitu k signálům zastavujícím buněčný cyklus, může inaktivovat apoptózu, získává neomezený replikační potenciál, posiluje angiogenezi a finálně je schopna tvorby metastáz. Všechny tyto změny jsou akcelerovány a do jisté míry umožněny nestabilitou genomu. Nádorová tkáň získává tento fenotyp mutacemi v genech, které řídí buněčnou proliferaci a diferenciaci, apoptózu, reparaci DNA a metabolismus. (Hanahan, 2000; Hanahan, 2011)

2.2 Získané vlastnosti maligní nádorové tkáně podle Roberta A.

Weinberga a Douglase Hanahana

2.2.1 Soběstačnost nádorové tkáně v produkci růstových signálů

Buňky normální tkáně pro přechod z klidového stavu (G0 fáze) do aktivního proliferativního stavu (G1 fáze) vyžadují mitogenní růstové signály. Tyto růstové signály buňka přijímá pomocí receptorů. Buňky normální tkáně nemohou proliferovat bez přítomnosti těchto růstových signálů. Nádorové buňky však dokáží tyto růstové signály nahradit, a tak se stávají nezávislými na regulaci okolního prostředí. Takto je narušena tkáňová homeostáza ve směru zvýšené proliferace buněk. (Hanahan, 2000)

2.2.2 Necitlivost nádorových buněk k signálům zastavujícím postup buněčným cyklem

V normální tkáni jsou buňky v klidové fázi (G0 fázi) udržovány tzv. antiproliferativními signály. Proliferaci blokují dvěma odlišnými mechanismy - buňku směřují do G0 fáze nebo do postmitotické fáze, v těchto fázích buňka neproliferuje. Nádorové buňky nereagují na antiproliferativní signály dostatečně a tím si uchovávají tedy svoji proliferační aktivitu. (Hanahan, 2000)

V G1 fázi buněčného cyklu buňky na základě signálů z vnějšího prostředí buď dále postupují buněčným cyklem a vstupují do S fáze nebo vystupují z buněčného cyklu a vstoupí do klidové fáze - G0 fáze. Většina antiproliferačních signálů moduluje signální dráhy využívající protein retinoblastom (pRb) a proteiny - p107 a p130. Rb protein v defosforylovaném stavu blokuje transkripční faktor E2F, aktivující expresi genů nezbytných pro vstup buňky do S fáze. Po fosforylaci Rb proteinu cyklin-dependentními kinázami dochází k uvolnění transkripčního faktoru E2F a tím je umožněna buněčná proliferace. Ztrátou funkce Rb proteinu (prostřednictvím mutací obou alel genu) buňka může získat neodpovídavost vůči přirozeným antiproliferačním signálům (Hanahan, 2000).

Proces nekontrolované proliferace buněk nezávisí pouze na rezistenci vůči antiproliferačním signálům. Tkáně lidského těla regulují proliferaci, respektive množství buněk také tím, že je mohou směřovat k diferencovanému fenotypu. Terminálně diferencovaná buňka ztrácí schopnost proliferace. Nádorové buňky jsou schopny uplatnit řadu strategií, jak zabránit terminální diferenciaci. Jedna ze strategií využívá zvýšenou expresi onkoproteinu Myc. Za fyziologických podmínek komplex Mad-Max indukuje diferenciaci buněk. Pokud však dojde v nádorové tkáni k nadprodukci proteinu Myc, protein Mad je vytěsněn z komplexu Mad-Max a nahrazen proteinem Myc. Vzniká tak komplex Myc-Max, který mění transkripci opačným směrem, než k diferenciaci buňky. (Hanahan, 2000)

2.2.3 Zabránění vstupu do apoptózy

Vlastnost populací nádorových buněk přežít a dále se šířit je dána nejen rychlostí buněčné proliferace, ale také schopností ovlivnit rychlost odumírání jednotlivých buněk nádorové tkáně. Hlavním buněčným mechanismem, řídícím zánik buněk je apoptóza. Zabránění vstupu buněk do apoptózy je charakteristickým znakem většiny nádorových buněk a populací (Hanahan, 2000).

Proces apoptózy je aktivován různými fyziologickými signály, jako je například poškození DNA, hypoxie, buňkami imunitního systému. Vlastní apoptóza představuje kaskádu reakcí aktivujících klíčové proteiny apoptózy – kaspázy. Výsledkem aktivace kaspáz je narušení buněčných membrán, destrukce cytoskeletu, inhibice proteisyntézy a fragmentace jádra. Apoptóza po aktivaci může proběhnout za 30-120 minut. Apoptotická tělíska jsou pohlcena fagocyty. (Hanahan, 2000)

Nádorové buňky se stávají rezistentními vůči aktivaci apoptózy nejčastěji ztrátou funkce proteinu p53 poškozením alel genu TP53. Protein p53 je transkripční faktor, který po fosforylaci proteiny registrující porušení struktury DNA, zastavuje průchod buňky buněčným cyklem a aktivuje reparační procesy. Pokud buňka není schopna DNA opravit, je aktivován proces apoptózy. (Hanahan, 2000)

2.2.4 Neomezený replikační potenciál buněk

Přestože uvedené získané vlastnosti nádorovou buňkou (soběstačnost v produkci růstových signálů, rezistence k signálům zastavujícím buněčný cyklus a zabránění apoptóze) umožňují na signálech z okolí nezávislý buněčný růst, není to dostačující k vytvoření velkých populací buněk, které vytvářejí makroskopickou tkáň nádoru. Každá buňka obsahuje z podstaty replikace DNA lineárních úseků vnitřní mechanismus, který limituje její replikační potenciál. Aby mohla vzniknout velká populace buněk vytvářející makroskopický nádor, musí nádorové buňky mít schopnost tento mechanismus přerušit. (Hanahan, 2000)

Nádorové buňky získávají schopnost zabránit procesu zkracování koncových úseků DNA (telomer) tím, že exprimují enzym telomerázu. Telomeráza zajišťuje úplnou replikaci konců lineárních úseků DNA, ke zkracování telomer tudíž nedochází a nádorové buňky získávají neomezený replikační potenciál. (Hanahan, 2000)

2.2.5 Posílení angiogeneze nádorovou tkání

Kyslík a živiny, které jsou dodávány buňkám cévami, jsou pro fungování buněk a jejich přežití nezastupitelné. Proto jsou fyziologicky buňky tkáně ve vzdálenosti maximálně 100 μm od krevních kapilár. Při růstu buněčných populací tvořících novou tkáň je růst nových kapilár a cév, proces angiogeneze, omezen a přísně regulován. Rychle proliferující a rostoucí nádorové buňky si proto musí vyvinout schopnost porpory angiogeneze, jinak by trpěly nedostatkem kyslíku a živin. (Hanahan, 2000)

Schopnost indukovat angiogenezi získávají nádorové buňky vychýlením rovnováhy mezi induktory a inhibitory angiogeneze směrem k její indukci. To realizují nádorové buňky získanou produkcí faktorů, stimulujících angiogenezi. Nádorové buňky produkují zejména VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a FGF1/FGF2 (kyselý a bazický fibroblastový růstový faktor). (Hanahan, 2000)

2.2.6 Tvorba vzdálených ložisek - metastáz

Během růstu většiny nádorů často dochází k uvolnění nádorových buněk a jejich migraci lymfatickými nebo krevními cestami. Některé z těchto buněk mají schopnost zakládat nová ložiska růstu nádorových buněk, tzv. sekundární nádory neboli metastázy. Právě metastázy jsou až v 90 % případů příčinou úmrtí na onkologické onemocnění. Tak jako buňky primárního nádoru, i buňky metastáz si musí zachovat výše uvedené vlastnosti, aby byly schopny dále přežívat. (Hanahan, 2000)

2.2.7 Nestabilita genomu

Nestabilita genomu nádorových buněk je vlastnost, která napomáhá, prostřednictvím změn DNA, k získání výše zmíněných fenotypových vlastností, nezbytných pro vznik maligního nádoru. U maligních nádorů vznikají jednak změny v genech kódujících proteiny podílejících se na opravách molekul DNA a v genech, jejichž produkty řídí a realizují buněčný cyklus a apoptózu. (Hanahan, 2000)

2.3 Deregulované geny v nádorových buňkách - onkogeny a tumorsupresory

Geny, jejichž deregulace genové exprese nebo změna kódující sekvence DNA, umožní nádorovým buňkám získání uvedených vlastností, můžeme rozdělit na onkogeny (resp. protoonkogeny) a tumorsupresory. (Kráal, 2016; Lodish, 2013)

2.3.1 Protoonkogeny a onkogeny

Protoonkogeny jsou všechny fyziologicky fungující geny, které podporují průchod buňky buněčným cyklem, inhibují apoptózu a reparaci DNA, podílejí se na angiogenezi. Jejich mutací vznikají onkogeny, jejichž produkt následně podporuje nádorovou transformaci. Pro onkogeny jsou v tomto smyslu charakteristické mutace typu získání funkce. Jejich výsledkem je protein s neregulovanou aktivitou nebo protein neodpovídající na inhibiční signály, případně zvýšená hladina strukturně nezměněné formy proteinu. (Adam, 2003)

2.3.2 Tumorsupresorové geny

Tumorsupresorové geny (tumorsupresory) jsou geny, jejichž produkty zpětnovazebně inhibují průchod buňky buněčným cyklem nebo aktivují apoptózu či se podílejí na reparacích DNA. Jsou pro ně charakteristické mutace typu ztráty funkce. U hereditárních (dědičných) forem nádorů jedinec zdědí jednu mutovanou alelu od

některého z rodičů, a poté, co je poškozena druhá alela, dojde ke ztrátě funkce příslušného tumorsupresoru a podpoře nádorové transformace. Tumorsupresory je možné klasifikovat do dvou skupin – na tumorsupresory tzv. vrátne „gatekeepery“ a na tumorsupresory tzv. strážce „caretakery“. Tumorsupresorové geny označované za vrátne regulují průchod buňky buněčným cyklem nebo aktivují apoptózu. Patří mezi ně gen Rb či APC. (Adam, 2003)

Tumorsupresory ze skupiny tzv. strážců udržují integritu genomu prostřednictvím oprav molekuly DNA. Řadíme mezi ně například geny BRCA1, BRCA2, MLH1 a MSH2. (Adam, 2003)

3 NÁDOROVÉ MARKERY

3.1 Obecná charakteristika nádorových markerů

Nádorové markery jsou dnes součástí rutinní klinické praxe řady onkologických onemocnění, zároveň se v posledních dvaceti letech plynule mění nejen jejich spektrum, ale i způsob jejich klinického použití. Spektrum klinicky používaných nádorových markerů se rozšířilo o nové markery, které se sice v lidském organismu běžně vyskytují a regulují řadu fyziologických pochodů, ale v kancerogenezi dochází ke zvýšení nebo naopak i snížení, potlačení jejich produkce. Proto nyní již většinou nehovoříme o nádorových makrech, ale o biologicky aktivních látkách neboli biomarkerech. V průběhu onemocnění jsou hladiny markerů stanovovány opakovaně a je užitečné sledovat dynamiku změn. Výsledek stanovení nádorových markerů se pak stává, vedle klinického obrazu a výsledků invazivních vyšetření, jednou z komponent, na jejichž základě se lékař rozhoduje. (Kaušitz, 2014)

3.2 Definice a rozdělení nádorových markeru

Při diagnostice, stanovování prognózy či určení nejvhodnější léčby onkologických onemocnění se ve stále větší míře využívají biomarkery. Nádorové markery, skupina biomarkerů, jsou definovány jako molekuly převážně proteinového charakteru, které jsou přítomny v organismu v důsledku vzniku a vývoje maligního procesu. Jejich výskyt ve tkáni nádoru a v tělních tekutinách souvisí s růstem nádoru a jsou produkovány buď samotným nádorem, nebo jinými tkáněmi jako odpověď na maligní proces v organismu. Jedná se o skupinu různorodých látek, ať již podle povahy, či biochemické struktury, lokalizace v buňce, strance chemického složení. Společným jejich jmenovatelem je, že mohou v příznivých případech umožnit detekovat nádor o hmotnosti 1 mg (10^6 nádorových buněk), zatímco klinická diagnóza je určena většinou až u nádoru, který obsahuje asi 10^9 buněk. Základní poučkou platnou až na malé výjimky je to, že neexistuje biomarker, který by byl nádově či orgánově specifický. (Kaušitz, 2014; Molina 2013)

Požadavky na ideální nádorový marker:

- je produkován pouze u maligních onemocnění
- je orgánově specifický
- vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
- koreluje s velikostí nádoru

- koreluje se stádiem onemocnění
- koreluje s prognózou
- koreluje s účinností terapie
- umožňuje monitorovat efekt léčby
- umožňuje diagnostiku relapsu, či progresse onemocnění
- umožňuje odkrýt nádorovou duplicitu

V klinické praxi v současnosti neexistuje žádný biomarker, který by tato kritéria splňoval. Ale na druhé straně většina biomarkerů některá tato kritéria splňuje. Je proto nutné si uvědomit optimální indikace po požití a současně si i uvědomit limitace vyšetření. Správně indikované vyšetření nádorových markerů může přispět především k včasnému záchytu recidivy či progresse onemocnění a tím i k rychlejšímu terapeutickému zákroku, který může prodloužit život nemocného. (Kaušitz, 2014)

V Tabulce 6 jsou uvedeny nejčastěji v klinické praxi vyšetřované nádorové markery a jejich rozdělení nádorových biomarkerů podle funkce.

Tabulka 6: Rozdělení nádorových biomarkerů podle funkce (Kaušitz, 2014)

Skupina markerů:		Jednotlivé markery.
Onkofetální a mucinózní antigeny	Mající funkci u plodu	<ul style="list-style-type: none"> • CEA • AFP • hCG • SP1
	Karbohydrátové(cancer) antigeny	<ul style="list-style-type: none"> • CA 125 • CA 15-3 • CA 19-9 • CA 50 • CA 72-4
Cytokeratinové nádorové markery		<ul style="list-style-type: none"> • TPA • TPS • CYFRA 21.1 • SCC
Enzymy	Proliferační	<ul style="list-style-type: none"> • Neuronspecifická enoláza • Thymidinkináza
	Ostatní	<ul style="list-style-type: none"> • Prostatický specifický antigen • Kyselá prostatická fosfatáza • Laktátdehydrogenáza
Hormony	Produkované nádorem (hormonálně aktivní nádory)	<ul style="list-style-type: none"> • Placentární laktogen • Kalcitonin • Parathormon • Prolaktin
	Ektopická sekrece	<ul style="list-style-type: none"> • Adrenokortikotropní hormon • Antidiuretický hormon • Kortizon • Parathormon • Prolaktin
	Rizikový faktor nádorového bujení	<ul style="list-style-type: none"> • D vitamni • Adiponektin • Leptin
Receptory		<ul style="list-style-type: none"> • Estrogenové

	<ul style="list-style-type: none"> • Progesteronové • Adhezivní molekuly
Ostatní blíže nespecifikované látky	<ul style="list-style-type: none"> • Feritin • β_2-mikroglobulin • Imunoglobuliny

3.2.1 Onkofetální antigeny

Onkofetální antigeny jsou látky, které jsou nacházeny v poměrně vysokých koncentracích u plodu, kde se vyskytují na povrchu diferencujících se buněk (diferenciační antigeny) a hrají významnou roli ve vývoji plodu. U zdravých dospělých osob je jejich hladina velice nízká a přesná biologická funkce není známa. Při většině nádorových onemocnění se jejich aktivita výrazně zvyšuje. Typické pro ně je, že se vyskytují především u dobře diferencovaných nádorů a jejich hladina většinou koreluje s velikostí nádorové masy. Jejich stanovení má význam zejména pro určení prognózy nádorového onemocnění a kontrolu terapie. (Kaušitz, 2014)

3.2.2 Cytokeratinové biomarkery

Cytokeratinové biomarkery vznikají jako důsledek poškození cytoskeletu, intermediálních filament buňky. V cirkulaci jsou přítomny jako rozpustné fragmenty především cytokeratinů 8, 18, 19. Kromě buněčné degradace úzce souvisejí i buněčnou proliferací. Jejich zvýšené hladiny jsou zaznamenány fyziologicky při všech regeneračních procesech a dále za patologických situací především při invazivním růstu a metastazování. Cytokeratiny se vyskytují jak v normálním epitelu (jednoduchý, žlázo- vývodový, přechodný apod.), tak v nádorových buňkách odvozujících se od epitelů (mléčná žláza, plíce, ovarium, střevo, trachea, močový měchýř, pankreas, většina endokrinních žláz, prostata apod.). Jak bylo řečeno, cytokeratiny vytvářející intermediární filamenta cytoskeletu, jsou dvou typů: cytokeratinů: typ I - kyselé cytokeratininy 9 – 19 a cytokeratiny typ II neutrální a bazické 1 – 8. Jsou prokazovány protilátkami různě označovaných testů. Tabulka 7 uvádí reaktivitu různých testů proti fragmentům cytokeratinu. U maligních nádorů v progresi (šíření do okolí) dochází k proteolytickému odštěpování solubilních fragmentů, které se dostávají do krevního oběhu a jsou tak detekovatelné jako markery nádorové proliferace. (Kaušitz, 2014)

Tabulka 7: Reaktivita různých testů/protilátek proti fragmentům cytokeratinu (Kaušitz, 2014; Molina, 2013)

Test/protilátka	Fragment 8	Fragment 18	Dimer 8/19	Fragment 19
TPA	+++	+	+++	+++
TPS	+	+++	+	+
CYFRA 21-1	-	-	+++	+++

3.2.3 Enzymatické nádorové markery

Enzymatické nádorové markery jsou po onkofetálních antigenech druhou nejčastěji užívanou skupinou nádorových markerů. Jsou rozdělovány na dvě podskupiny. První podskupinu tvoří enzymy mající biologickou funkci především při buněčném dělení, (např. thymidinkináza a neuron-specifická enoláza). Tyto markery jsou značně zvýšené u všech stavů charakterizovaných především výraznou buněčnou proliferací. Proto se uplatňují při určování prognózy a stadia onemocnění. Markery druhé podskupiny jsou enzymy, které se vyskytují i ve zdravých tkáních, kde plní své biologické funkce. Tyto markery jsou vysoce orgánově či tkáňově specifické, ale neposkytují jakoukoliv informaci o typu poškození daného orgánu či tkáně. Dají se použít k určení primární lokalizace nádoru.

Dalším typem nádorových markerů jsou hormony. Jsou produkovány buď přímo endokrinními buňkami (např. kalcitonin medulárním karcinomem štítné žlázy nebo tyreoglobulin při typu folikulárním) nebo jsou produkovány ektopicky (např. látka podobná ACTH nebo hCG při bronchogenním karcinomu). Tyto nádorové markery jsou nejčastěji využívány ke kontrole efektu chirurgické či medikamentózní léčby.

U hormonálně aktivních nádorů se stanovuje množství receptorů. Na rozdíl od předchozích markerů, které se převážně stanovují v séru, jde o markery tkáňové, které se stanovují v bioptickém materiálu. Mají jednak význam zejména pro predikci a kontrolu terapie (např. u nádorů prsu). (Kaušitz, 2014)

3.2.4 Adhezivní molekuly

Adhezivní molekuly zahrnují asi 70 látek imunoglobulinového typu. Tyto molekuly mají zásadní význam nejen v celé řadě fyziologických procesů (embryogeneze, imunitní reakce, reparace poškozených tkání), ale uplatňují se i v celé řadě procesů patologických. V případě adheze agregátů nádorových buněk s krevními destičkami se uplatňují především selektin E, a dále imunoglobuliny ICAM-1, ICAM-2 a VCAM-1, které se

v interakci s cytokiny podílejí na aktivaci endotelu a následné adhezi agregátů destiček a metastatických nádorových buněk k endotelu. (Kaušitz, 2014)

3.2.5 Blíže nespecifikované látky

Poslední skupinu nádorových markerů tvoří nejružnější tkáněmi produkované blíže nespecifikované látky, které se nedají zařadit do žádné z předchozích skupin, ale při nádorovém bujení se jejich hladiny v krvi zvyšují jako nespecifická reakce organismu na přítomnost nádorového onemocnění (ferritin, β_2 -mikroglobulin, imunoglobuliny).

3.2.6 Nádorové markery využívané v diagnostice a léčbě karcinomu kolorekta

Indikace vyšetření nádorových markerů u karcinomu tlustého střeva mají své limity. Jedná se o doplňkovou diagnostickou metodu. Pro správnou interpretaci výsledků je proto nezbytná nejen správná volba nádorových markerů, ale především způsob jejich klinického vyhodnocení, které vyžaduje úzkou interdisciplinární spolupráci mezi klinikem a laboratorním pracovníkem.

U nádorů tlustého střeva a konečníku je hlavním stanovovaným markerem karcinoembryonální antigen (CEA). Jako marker druhé volby je doporučován CA 19-9. Jako optimální se jeví kombinace těchto dvou markerů. K dalším markerům, které jsou studovány v souvislosti s kolorektálním karcinomem, patří CA 72-4, dále pak další nádorové markery CA typu (CA 242, CA 195), markery cytokeratinu (TPA, TPS) a řada dalších. (Kaušitz, 2014)

3.2.7 Karcinoembryonální antigen (CEA)

CEA dnes stále patří k základním nádorovým markerům. Tento protein patří do skupiny onkofetálních glykoproteinů s molekulovou hmotností 180–200 kDa. Za fyziologických podmínek je produkován ve vyvíjejícím se embryu. V dospělosti je v malé míře produkován epiteliálními buňkami gastrointestinálního traktu či bronchů. Jako nádorový marker není orgánově ani tkáňově specifický. CEA není vhodný pro screening nádorových onemocnění, stejně tak v primární diagnostice je jeho výpovědní hodnota omezená. CEA je nejpřínosnější při follow-up (sledování) kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu, plic, močového měchýře a dalších malignit. V těchto případech je CEA produkován nádorovou tkání a jeho hladiny dobře korelují s objemem nádorové hmoty. (Beauchemin, 2013)

3.2.8 Nádorový antigen CA 19-9

CA 19-9 je mucin-sialo-glykolipid s molekulovou hmotností vyšší než 500 kDa. Patří mezi onkofetální nádorové markery. Přítomnost CA 19-9 je spojena s Lewis(a) determinantou krevní skupiny. U vzácněji se vyskytující Lewis(a-/b-) skupiny není CA 19-9 produkován. CA 19-9 se za fyziologických podmínek vyskytuje v epitelových buňkách plodu, především v gastrointestinálním traktu, pankreatu a žlučovodech. U dospělých je secernován v malé míře epiteliálními buňkami gastrointestinálního traktu a bronchů. Ve velmi nízkých koncentracích se vyskytuje v krvi, ascitu, pleurálním výpotku a mozkomíšním moku. CA 19-9 se vylučuje žlučí. CA 19-9 není vhodný pro screening nádorových onemocnění a jeho role v primární diagnostice je podobná jako u CEA. CA 19-9 se uplatňuje především při follow-up karcinomu žaludku, žlučníku a žlučových cest, kolorektálního karcinomu, primárního karcinomu jater. Koncentrace CA 19-9 jsou též spojeny s hmotou nádoru. (Fiala, 2015)

3.2.9 Tkáňový polypeptidický antigen (TPA)

TPA je komplex cirkulujících fragmentů cytokeratinů 8, 18 a 19. Výskyt TPA byl prokázán ve většině karcinomů, ale nebyl prokázán v klidové zdravé tkáni. Jeho výskyt je spojen s rychle se dělícími buňkami. TPA se zvyšuje v těhotenství. Zvýšené hladiny nalézáme též u zánětů. Za fyziologických podmínek je TPA produkován trofoblastem placenty, játry, plicemi, střevem a ledvinami vyvíjejícího se plodu. TPA je nespecifický nádorový marker, který je obecně spojený s dělením buněk a může být zvýšený i u jiných než nádorových onemocnění. TPA se používá jako doplňkový marker k nádorovým markerům spojeným s hmotou nádoru a informuje nás o aktivitě nádorových buněk. Tato aktivita může odrážet proces dělení buněk, ale i jejich degradaci s nekrózou. (Nicolini, 2015)

3.2.10 Tkáňový polypeptidický specifický antigen (TPS)

TPS má velice podobnou charakteristikou jako TPA, a je definován vlastně další monoklonální protilátkou, použitou k jeho detekci. Tato protilátka je namířena proti epitopu M3 molekuly TPA. TPS je nespecifický nádorový marker a používá se podobně jako TPA, což znamená doplňkový marker k nádorovým markerům spojeným s hmotou nádoru. TPS je tedy schopný zachytit maligní růst v různých orgánech, ale může být zvýšen i u nemaligních onemocnění. (Duffy, 2003)

3.2.11 Fibroblast growth factor 23 (FGF 23)

FGF23 je protein ze skupiny fibroblastových růstových faktorů (FGF). Jeho hlavní fyziologickou funkcí je regulace koncentrace fosfátů v séru. První molekula rodiny FGF byla identifikována v extractech hypofýzy v roce 1973. Růstové faktory rodiny FGF mají ve tkáních lokální účinky pouze. FGF 19, FGF 21 a FGF 23 dokáží působit i systémovým mechanismem. FGF 23 je vylučován osteocyty v reakci na zvýšenou koncentraci účinné formy vitamínu D-kalcitriolu. Místem účinku FGF 23 jsou ledviny, kde v proximálním tubulu snižuje aktivitu sodno-fosfátové pumpy. Následkem je snížení reabsorbce a zvýšení exkrece fosfátů. FGF23 je též inhibítorem 1-alpha-hydroxylázy, která katalyzuje přeměnu zásobní formy vitamínu D (kalcidiolu) na aktivní formu vitamínu D (kalcitriol), což vede ke snížení absorpce vápníku.

Gen pro FGF 23 je lokalizován na chromozomu 12. Mutace v tomto genu, které činí FGF 23 rezistentní k proteolytickému štěpení vedou ke zvýšené aktivitě FGF 23 a ke zvýšené ztrátě fosfátů. Klinicky se tato mutace projevuje jako autozomálně dominantní onemocnění hypofosfemická rachitida. FGF23 se nadměrně produkuje též u některých typů nádorů například u benigního mezenchymálního nádoru způsobujícího osteomalácií – paraneoplastického syndromu. Ztráta účinku FGF 23 vede ke zvýšení hladiny fosfátů v séru. U pacientů s renální insuficiencí a u dialyzovaných pacientů se mohou hodnoty FGF 23 pohybovat v řádu několika set až tisíců pg/ml. Toto zvýšení hodnot znemožňuje další diagnostické využití u těchto pacientů. (Vervloet, 2014; Mettang, 2017)

V posledních letech se objevilo několik prací zkoumajících vztah FGF 23 k chromozomálními abnormalitám u kolorektálního carcinomu (Leaf, 2013; Sheffer, 2009). Stejně tak se další práce zabývají vztahem hladin FGF23 a vitamínu D v možné účasti FGF 23 v procesu onkogeneze. Závěry zatím naznačují, že zvýšené hladiny FGF 23 mohou být zapojeny do procesu vývoje kolorektálních neoplázií nezávisle na hladinách vitamínu D (Jacobs, 2011). Nové výsledky výzkumu ukazují na zapojení FGF 23 do procesu angiogeneze. Aktivita glykolytického enzymu hexokinázy 2 (HK2) je kontrolována pomocí signalizace FGF, která je přenášena přes FGF receptor. Pokles hladin HK2 v nepřítomnosti signalizačních vstupů zaznamenávaných receptorem FGF vede ke snížení glykolýzy, což vede k narušení proliferace a migrace endoteliálních buněk. Zvýšená stimulace receptoru FGF naopak proliferaci a migraci buněk endotelu podporuje. (Yu, 2017) Tento mechanismus byl zatím prokázán na zvířecím modelu.

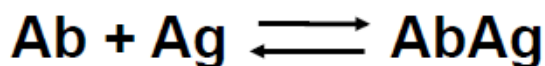
Na základě výše uvedených publikovaných výsledků o efektu molekuly FGF 23 (jejím významu v podpoře proliferace, migrace buněk, angiogeneze, vztahu k vitamínu D) a zároveň na základě znalosti nádorové patogeneze, tak jak byla popsána v úvodní kapitole, jsme předpokládali, že stanovení hladiny molekuly FGF 23 u onkologických pacientů může poskytnout lékaři informace o procesu karcinogeneze a může přispět v diagnostice a následně v léčbě, v našem případě pacientům s kolorektálním karcinomem.

4 METODY STANOVENÍ BIOMARKERŮ

Parametry biologické aktivity lze detekovat imunohistochemicky v cytosolu nádorové buňky (celulární markery) nebo cirkulující v krvi či jiných tělních tekutinách (humorální markery). Na úrovni proteinu se stanovují zpravidla pomocí metod imunochemické analýzy. Tyto metody získávají postupem času stále větší popularitu. Od čistě klinického použití se dnes rozšiřují do mnoha dalších oblastí, kde je vyžadováno specifické, rychlé a levné stanovení koncentrace určité látky, analytu v přítomnosti dalších komponent (Wild, 2005).

4.1 Principy analytických metod založených na reakci antigen-protilátka

Reakce antigen-protilátka *in vivo* je základem imunitní odpovědi našeho organismu. Využití interakce antigen-protilátka *in vitro*, se stalo základem všech imunochemických metod, které nám umožňují detekovat různé analyty s vysokou citlivostí (detekční limit 10^{-15} až 10^{-20} mol/l⁻¹). Základem metod je, jak bylo řečeno, reakce antigenu (Ag) a protilátky (Ab) za vzniku imunokomplexu (AbAg).



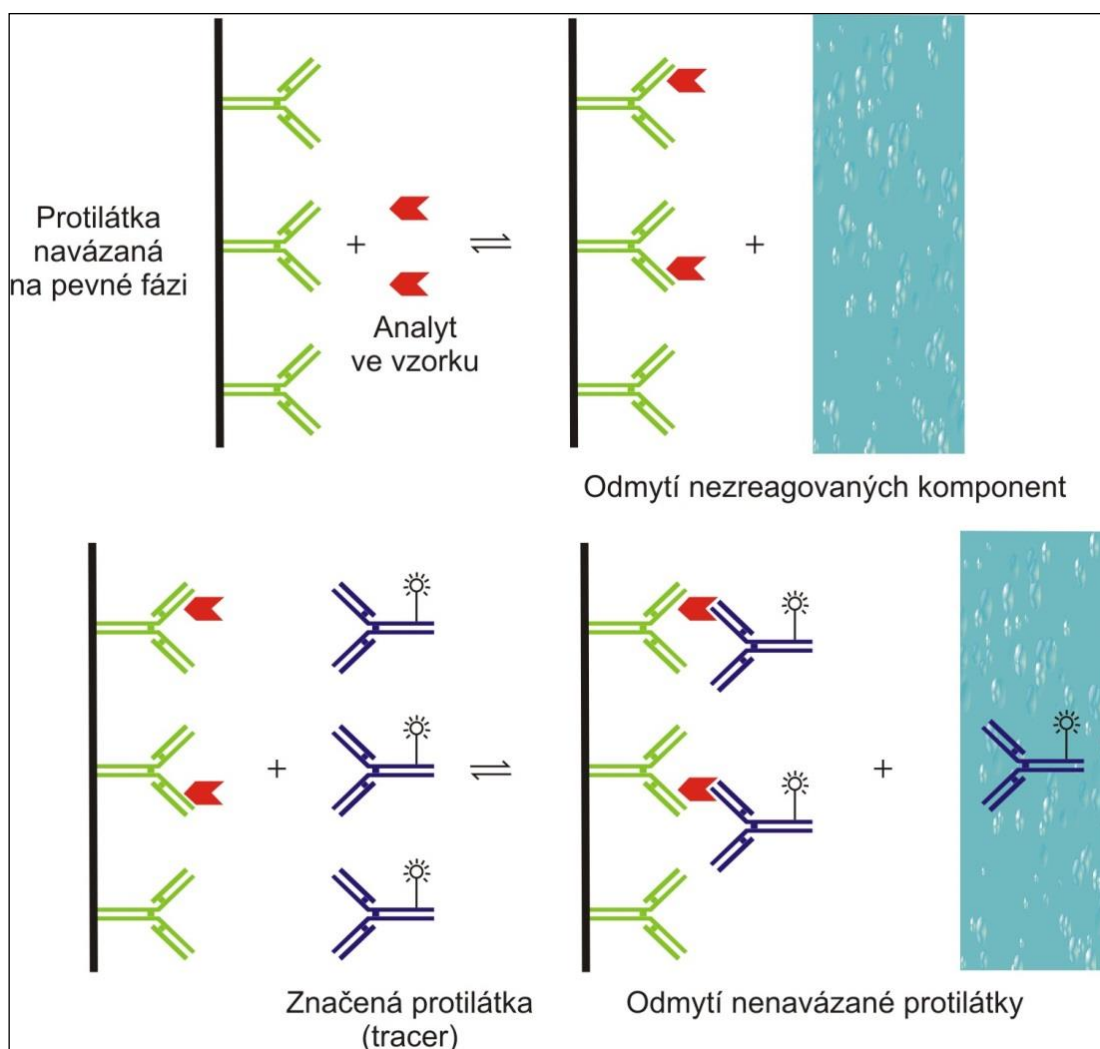
Pro detekci a kvantifikaci výsledku je nutné označit jednu složku reakce, protilátku či antigen, indikátorem (radioaktivní izotop, enzym, luminiscenční látka, fluorescenční látka). Imunochemické metody dělíme na kompetitivní a nekompetitivní. U kompetitivních metod je přítomno omezené množství protilátky. O vazebná místa na této protilátce soutěží neznačený antigen ze vzorku (stanovovaná látka) a určité množství přidaného značeného antigenu o známé koncentraci. U nekompetitivních metod je první protilátka přítomna ve velkém nadbytku. Po navázání antigenu ze vzorku (stanovované látky) se přidá druhá značená protilátka, zpravidla proti jiné antigenní determinantě stanovované molekuly. Výsledkem je vazba první protilátka-antigen-druhá protilátka (tzv. sendvič), podle kterého se tyto metody také někdy nazývají. (Wild, 2005)

4.1.1 Imunoradiometrická analýza (IRMA)

Metoda IRMA využívá pro stanovení dvou protilátek, z nichž jedna je fixována na stěnu zkumavky a druhá je označena radioizotopem například radioaktivním I¹²⁵ (tracer).

Po přidání vzorku, který obsahuje stanovovanou látku (antigen) dojde k navázání stanovované látky na protilátku, která je fixována na stěně plastové zkumavky. Poté následuje promytí vhodným roztokem a odstranění nezreagovaných, nenavázavých komponent. Dále je přidána značená druhá protilátka (tracer). Následně se opět odmyjí nenavázané reagensie. V posledním kroku se provádí měření vázané radioaktivity na analyzátoru (Obrázek 1). Naměřená radioaktivita je přímo úměrná k množství stanovované látky, analytu ve vzorku. (Ekins, 1979)

Obrázek 1: Princip metody IRMA



Zdroj: doc. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

4.1.2 Sandwich Chemiluminescent Immunoassay (CLIA)

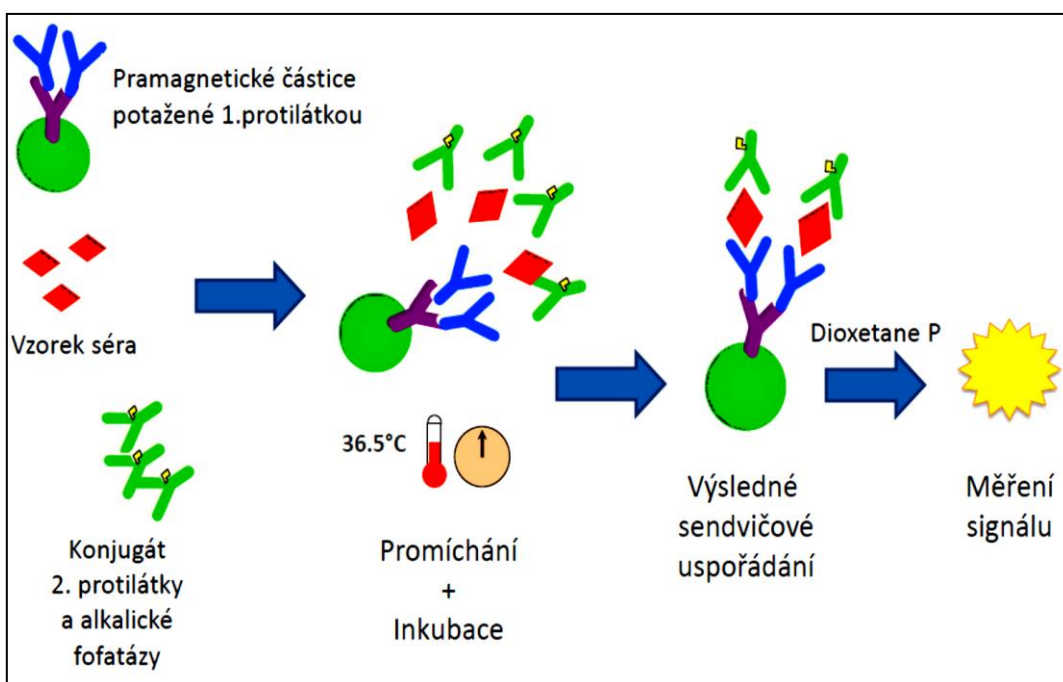
Metoda CLIA je stejně jako metoda IRMA založena na nekompetitivním imunochemickém stanovení. K detekci jsou využívány luminofory, kdy k zahájení emise světelného záření dochází průběhem chemické reakce. Metody CLIA můžeme podle použitých komponent reakce rozdělit na dvě skupiny:

1) CLIA využívající enzym, kdy enzymatický substrát produkuje luminiscenční záření (Obrázek 2.).

2) CLIA bez využití enzymu, kdy je použita druhá protilátka, přímo značená luminiscenčním indikátorem (Obrázek 3.).

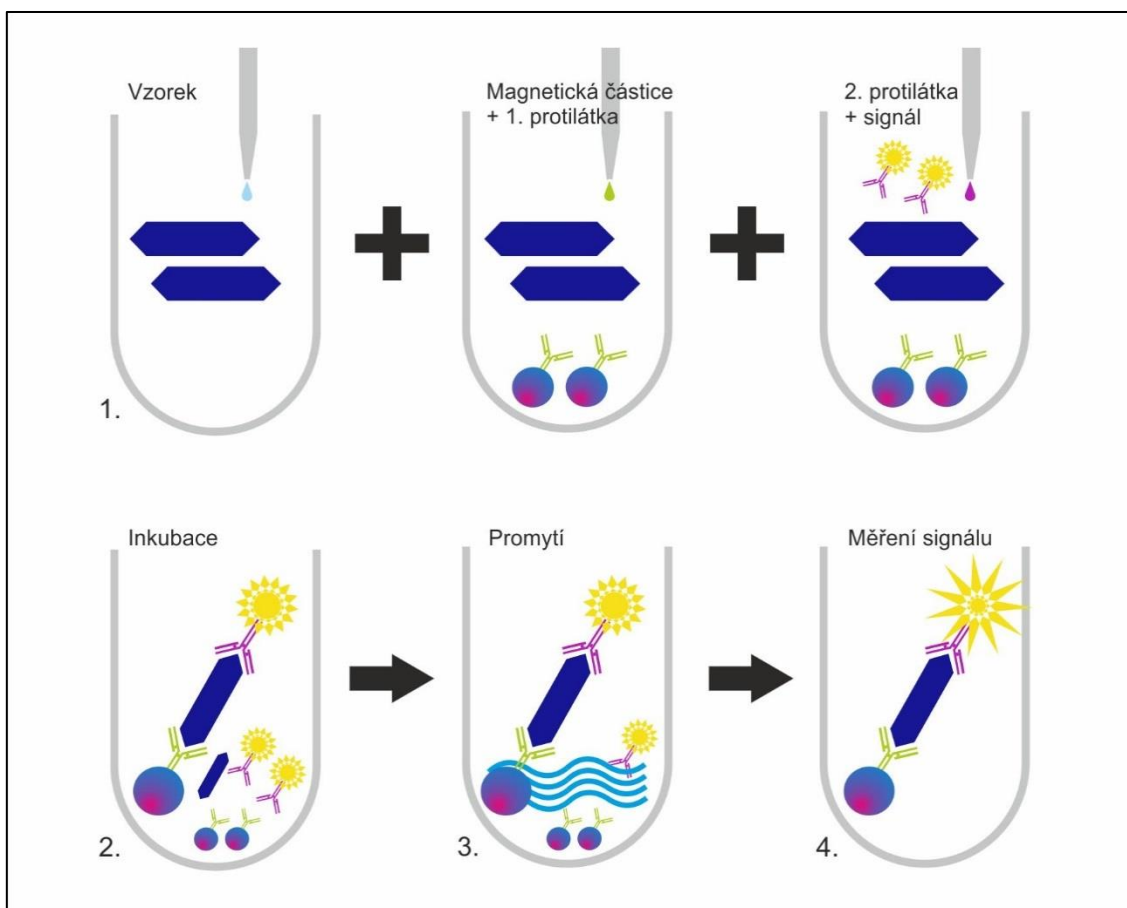
U obou variant CLIA dochází k reakci mezi dvěma protilátkami a dvěma epitopy stanovované molekuly. První protilátka je vázána na magnetických částicích, druhá je konjugována s alkalickou fosfatázou (ALP), v případě enzymatického provedení a v případě CLIA bez využití enzymu je druhá protilátka přímo konjugována s luminforem. Po inkubaci se provede separace a promytí. V první variantě reakce se přidá chemiluminiscenční substrát a po reakci s ALP se provádí měření. Ve druhé variantě reakce následuje po aktivaci luminoforu ihned měření. Emitované světlo je přímo úměrné koncentraci stanovované látky. (Cinquanta, 2017)

Obrázek 2: Princip metody CLIA využívající enzym



Zdroj: doc. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

Obrázek 3: Princip CLIA s protilátkou přímo značenou luminoforem



Zdroj: doc. PharmDr. Radek Kučera, Ph.D.

Souprava pro stanovení FGF 23 použitá v této bakalářské práci je založena právě na principu CLIA využívajícím enzym, kdy enzymatický substrát produkuje luminiscenční záření. Použili jsme soupravu LIASON FGF 23 pro stanovení na analyzátoru LIAISON XL firmy DiaSorin (Diasorin, Saluggia, Itálie). (Souberbielle, 2017)

PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zavedení metody stanovení hladin růstového faktoru FGF 23 ve vzorcích plazmy metodou CLIA (Sandwich Chemiluminescent Immunoassay) a dále stanovení hladin tohoto markeru v normální populaci a porovnání s hladinami stanovenými u vybraných onkologických onemocnění. Porovnání hladin FGF 23 s již zavedenými markery CEA, CA 19-9, TPA a TPS. Na základě výsledku určit možné využití tohoto biomarkeru.

5.1 Metodika

Byl vytvořen soubor vzorků plazmy a séra normální populace, nemocných s kolorektálním karcinomem a nemocných s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu. Účastníci studie poskytli informovaný souhlas s použitím vzorku plazmy pro výzkumné účely.

Byly stanoveny vybrané markery. Koncentrace FGF-23 a TPA byly stanoveny za použití chemiluminiscenčních kitů (metoda CLIA) LIAISON FGF-23 a LIAISON TPA (DiaSorin, Saluggia, Itálie). Koncentrace markerů CEA a CA 19-9 v séru bylo stanoveno za použití chemiluminiscenčních kitů ACCESS CEA a ACCESS CA 19-9 (Beckman Coulter, Brea, Kalifornie, USA). Sérové hladiny TPS byly stanoveny za použití imunoradiometrického kitu IRMA TPS (IDL Biotech, Bromma, Švédsko).

5.2 Výzkumné otázky

Po zavedení metody stanovení růstového faktoru FGF 23 metodou CLIA na přístroji LIAISON® XL byly stanoveny tyto výzkumné otázky:

- 1) Jaké jsou referenčních hodnoty růstového faktoru FGF 23 v normální populaci.
- 2) Jaké jsou hodnoty růstového faktoru FGF 23 u pacientů s kolorektálním karcinomem a pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu.
- 3) Porovnání hladin růstového faktoru FGF 23 u nemocných s nádorovým onemocněním s již používanými nádorovými markery - CEA, CA 19-9, TPA a TPS.

6 PRACOVNÍ POSTUP

6.1 Sběr a příprava souboru vzorků plazmy + preanalytika

Krev byla odebírána z kubitální žíly do odběrových zkumavek VACUETTE, (Greiner Bio-One, Rakousko). Pro potřeby stanovení FGF-23 byla odebírána nesrážlivá krev, pro ostatní stanovení byla odebírána krev srážlivá. Plazma či sérum byly odděleny centrifugací při $1\,370 \times g$ po dobu 10 minut a vzorky byly buď okamžitě zpracovány. Pokud je nebylo možno zpracovat do 3 hodin po odběru, byly zamrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a takto uskladněny až do doby zpracování. Náběry byly prováděny mezi 6. – 9. hodinou ranní. Sledované parametry nepodléhají cirkadiánnímu rytmu, takže časové hledisko nebylo nutné brát při vyhodnocení výsledků v úvahu. U všech pacientů byly stanoveny následující parametry: FGF 23, CEA, CA 19-9, TPA a TPS. Obsahem této bakalářské práce je stanovení FGF 23.

Převzetí a zavedení vzorku do systému na Příjmu biologického materiálu:

- 1) Po kontrole žádanky s údaji na zkumavce jsou do laboratorního informačního systému zapsány údaje ze žádanky včetně vybraných analyzovaných metod.
- 2) Je přiřazeno číslo + čárový kód, které jsou nalepeny na žádanku a zkumavku a alikvotační zkumavky.
- 3) Zkumavka s plnou krví (4 ml K_3EDTA , VACUETTE® TUBE, Greiner Bio-One, Rakousko) se centrifuguje při 4°C , otáčky RCF(g) 1370 -RPM(ot/min.) 3500, 10 min na centrifuze Hettich (Becmann Coulter, USA).
- 4) Po centrifugaci se zkupavka opatrně vyjme z centrifugy a umístí do stojánku na pracovní ploše.
- 5) Po 0,5 ml se rozpipetuje (aliquotuje) plazma do připravených 1 ml zkumavek typu eppendorf.
- 6) Kontrolují se údaje na zkumavce s krví a na alikvotačních zkumavkách.
- 7) Zkumavky s plazmou se uloží do papírové krabičky na 100 vzorků a umístí do hlubokomrazícího boxu na -80°C .

6.2 Stanovení markeru FGF 23 – analýza na přístroji LIAISON® XL

Stanovení hladin růstového faktoru FGF 23 bylo provedeno metodou CLIA na automatickém analyzátoru LIAISON® XL (Diasorin, Saluggia, Itálie), Obrázek 4. Vlastní postup analýzy je následující:

Obrázek 4: Analyzátor LIAISON® XL pro stanovení koncentrace analytu metodou CLIA na Oddělení imunochemické diagnostiky, FN Plzeň



Zdroj: autor bakalářské práce

- 1) Zapneme přístroj LIAISON® XL 60 minut před spuštěním analýzy (musí se vytemperovat vnitřní prostor).
- 2) Z hlubokomrazícího boxu vyndáme krabičku se vzorky souboru pacientů pro výzkumný úkol.
- 3) Vybereme vzorky k analýze, při RT (room temperature), necháme vzorky cca 60 minut vytemperovat na RT teplotu.
- 4) Následně je třeba provést denní úkony spojené s přípravou přístroje do stavu umožňujícího spuštění analýzy. Tyto úkony zahrnují:

5) Přihlášení uživatele do systému přístroje, dále → kontrola spotřebního materiálu (kyvety, jednorázové špičky, startovací reagentie, vyprázdnění infekčního plastového odpadu a tekutého odpadu ze zásobníku přístroje)

6) Rozbalení soupravy LIAISON FGF 23 (Obrázek 5). Před vložením kompletního činidla obsaženého v integrálu (plastová nádoba s chemikáliemi) do přístroje je nutné kompletně resuspendovat magnetické částice a to následujícím postupem:

Před odstraněním uzávěru z lahvičky otáčejte malým kolečkem v části s magnetickými částicemi, dokud se suspenze nezbarví dohněda. Suspendování magnetických částic napomůže jemné obracení lahvičky ze strany na stranu (je důležité zabránit vzniku pěny). Zrakem zkontrolujte dno lahvičky s magnetickými částicemi a ujistíme se, zda došlo k resuspendaci všech usazených magnetických částic. Po odstranění uzávěru pečlivě otrepe povrch každé prepážky integrálu, aby se případně odstranily zbytky kapaliny.

Obrázek 5: Souprava pro stanovení analytu FGF 23 metodou CLIA firmy Diasorin



Zdroj: autor bakalářské práce

7) Vložíme integrál s chemikáliemi pro danou analýzu (v našem případě FGF 23) a vložíme pomocné roztoky (nutné promývací roztoky potřebné k provozu přístroje).

8) Vložení kontrolních a kalibračních roztoků (jsou součástí dodávaných souprav). Na obrázku 6 vidíme otevřený analyzátor LIAISON® XL s prostorem pro vkládání stojánků s kalibračními roztoky a se vzorky.

11) Rozmražené a vytemperované vzorky se vortexují - 30s.

12) Vzorky plazmy (0,5 ml) přepipetujeme automatickou pipetou do očíslovaných zkumavek určených pro analýzu v přístroji LIAISON® XL. Na obrázku xx vidíme stojánek na vzorky se zkumavkami určenými k analýze plazmy FGF 23.

Obrázek 8: Stojánek pro zkumavky se vzorky na analýzu v přístroji LIAISON® XL



Zdroj: autor bakalářské práce

13) Vzorky umístíme do speciálního stojánku k přístroji.

14) Na přístroji LIAISON® XL v dialogovém okně pro vložení čísla vzorku zapíšeme číslo vzorku a vybereme metodu analýzy – CLIA FGF 23

15) Po zadání čísel všech vzorků a vložení stojánku se vzorky plazmy určenými k analýze do přístroje spustíme vlastní stanovení.

16) Provedeme kontrolu výsledků a kontrolu případných chybových hlášek. Na Obrázku 9 je tabulka naměřených hodnot koncentrací FGF 23 přístrojem LIAISON® XL. Tyto výsledky jsou následně exportovány do programu Excelu a dále hodnoceny.

Obrázek 9: Hodnoty koncentrace FGF 23, zobrazené výsledky na monitoru přístroje LIAISON® XL

ID vzorku	Test	Datum	Ředící	Výsledek	Jednotka	Kvalitativní	Příznaky	Odesláno	Název
AP1802210...	FGF23	2018-02-21 ...		49.56	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802210...	FGF23	2018-02-21 ...		64.55	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802200...	FGF23	2018-02-21 ...		43.82	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802160...	FGF23	2018-02-21 ...		53.21	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802160...	FGF23	2018-02-21 ...		40.04	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802160...	FGF23	2018-02-21 ...		27.18	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802150...	FGF23	2018-02-21 ...		38.99	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802140...	FGF23	2018-02-21 ...		73.58	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802130...	FGF23	2018-02-21 ...		57.87	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802120...	FGF23	2018-02-21 ...		45.27	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802120...	FGF23	2018-02-21 ...		59.72	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802120...	FGF23	2018-02-21 ...		66.62	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802120...	FGF23	2018-02-21 ...		54.27	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802090...	FGF23	2018-02-21 ...		41.01	pg/mL			2018-02-21 ...	
AP1802080...	FGF23	2018-02-21 ...		44.80	pg/mL			2018-02-21 ...	

Zdroj: autor bakalářské práce

17) Vytiskneme výsledné naměřené hodnoty.

18) Vyjmeme stojánky s použitými vzorky a umístíme je zpět do hlubokomrazicího boxu.

19) Vyjmeme integrály (obsahující chemikálie pro vlastní stanovení) a uskladníme je zpět v lednici (mohou být použity na další stanovení).

20) Vypnutí a údržba na konci pracovní doby. Po dokončení práce je možno systém LIAISON® XL ponechat zapnutý. Po uplynutí 30 minut doby nečinnosti systém samočinně přejde do pohotovostního režimu.

6.3 Kontrola kvality

U každého laboratorního výsledku musí být zaručena správnost a reprodukovatelnost výsledků. U běžných biochemických metod jako je například stanovení glykémie, cholesterolu existuje referenční nezávislá metoda, pomocí které lze požadované zjistit. Imunoanalýza je však vysoce citlivá metoda, neexistuje přesnější referenční metoda. Bylo proto v laboratořích nutno zavést takový systém kontroly, který by toto zaručoval.

Reprodukovatelnost krátkodobá (tj. v rámci jednoho stanovení) a dlouhodobá (tj. mezi stanoveními dlouhodobě i řadu roků) je zajištěno pomocí kontrolních sér dodávaných výrobcem a séry firmy Biorad určenými pro nezávislou interní kontrolu kvality. Správnost je zajištěna externí kontrolou kvality prováděnou organizací SEKK, které se pravidelně laboratoř účastní a má v ní 100% úspěšnost.

6.3.1 Kontrola stanovení - laboratorní

Výsledky z analyzátorů se přenášejí automaticky do laboratorního informačního systému. Cílem laboratorní kontroly je ověřit, že v průběhu přenosu výsledku nedošlo k závadě a že výsledek byl vždy přiřazen příslušnému pacientovi. Kontroluje se proces žádanka - analytika - výsledek.

6.3.2 Lékařská kontrola

Cílem této kontroly je zjistit hrubou chybu, která vznikla v průběhu preanalytiky nebo analytiky a činí výsledek nevěrohodným. Současně lékař provádějící kontrolu navrhuje nápravné opatření.

6.3.3 Interpretace výsledků

Interpretace výsledku je záležitost multioborová. Povinností lékaře laboratoře je při patologickém výsledku upozornit, eventuelně konzultovat ošetřujícího lékaře. Konzultace musí být podložena znalostí referenčních hodnot. Referenční hodnoty sledovaných nádorových markerů jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Referenční, hraniční a patologické hodnoty nádorových markerů CEA, CA 19-9, TPA, TPS (Kaušitz, 2014; Novotný 2012)

Biomarker	Jednotky	Cutt off pro hodnoty		
		Referenční	Hraniční	Patologické
CEA	ng/ml	0 - 3	3 - 5	> 5
CA 19-9	IU/ml	0 – 30	30 - 40	> 40
TPA	IU/ml	0 – 120	120 - 140	> 140
TPS	IU/ml	0 – 90	90 - 120	> 120

Dále při interpretaci výsledku je nutno znát všechny faktory, které výsledek mohou ovlivnit a vést k falešné pozitivitě či negativitě výsledku. Přehled onemocnění, které ovlivňují námi sledované markery je v následující Tabulce 9. Falešně negativní výsledky nacházíme buď při nesprávné indikaci vyšetření, nebo v situaci, kdy nádor z nejrůznějších důvodů marker neprodukuje.

Tabulka 9: Patologické stavy měnící referenční hodnoty hladiny nádorových markerů (Kaušitz, 2014; Novotný 2012)

Biomarker	Zvyšuje se u	
	Maligní onemocnění	U benigních onemocnění
CEA karcinoembryonální antigen	Ca žaludku, <i>Ca tračnicku, Ca rekta, ca prsu, nemalobuněčného karcinomu plic, ca štítné žlázy</i> ca vaječnicků, ca dělohy, ca prostaty Metastázy prsu a kolorekta do jater	<i>u kuřáků, chronickém ledvinovém, jaterním selhání benigních onemocnění GIT a jater a pankreatu, zánětlivých onemocnění plic, benigních adenomech prsu</i>
CA 19-9 Cancer nebo carbohydrate antigen	<i>Ca pankreatu, Ca žlučnicku a žlučových cest, primární</i> , Ca jater, Ca žaludku <i>Kolorekta, prsu ovarii (především mucinózního typu)</i> Ca dělohy Metastázy prsu a kolorekta do jater	cirhóza jater, akutní hepatitida, toxická hepatitida, chronická hepatitida, cholecystitida cholangoitida choledocholitiáza Akutní a chronická pankreatitida Benigní onemocnění žaludku a střeva (především zánětlivá a autoimunní)
TPA tkáňový polypeptidický antigen	<i>Ca prsu, nádory orofaciální oblasti, metastatický proces v játrech, hepatocelulární Ca</i> , Ca prostaty, Ca štítné žlázy, Ca plic nemalobuněčný, Ca ledvin, Ca močového měchýře, Ca ovarii, nádory varlat	<i>zánětlivá onemocnění, regenerační a reparační procesy</i> jaterní cirhóza hepatitida, diabetes mellitus , benigní onemocnění prsu, benigní onemocnění trávicího ústrojí, autoimunní onemocnění v těhotenství a prvních týdnech po porodu
TPS tkáňový polypeptidický specifický antigen	Ca prsu, nádory orofaciální oblasti, Ca jater, Ca pankreatu Nádory varlat a ca prostaty Ca štítné žlázy Ca plic, Ca ledvin, Ca ovarii	Regenerační a reparační procesy zánětlivá onemocnění Hepatitida, jaterní cirhóza, Diabetes mellitus, Benigní onemocnění prsu, benigní onemocnění trávicího ústrojí, autoimunní onemocnění

6.4 Charakteristika kontrolní skupiny a skupiny pacientů

6.4.1 Charakteristika kontrolní skupiny

Kontrolní skupinu tvořil náhodně vybraný soubor osob z populační studie MONICA. Tento projekt je v současné době realizován ve Fakultní nemocnici v Plzni a navazuje na celosvětovou studii o srdečních a cévních onemocnění zahájenou Světovou zdravotnickou organizací v roce 1985 (WHO, 1988). Kontrolní skupinu tvořilo 366 osob (176 mužů, 190 žen), věková charakteristika souboru je v Tabulce 10. Kontrolní soubor byl vybrán tak, aby se průměrný věk hodnocených skupin signifikantně nelišil. Zařazovací kritéria do kontrolní skupiny byla stanovena takto: negativní anamnéza na přítomnost tumoru, ledvinové nedostatečnosti, osteoporózy a její léčby.

6.4.2 Charakteristika souboru nemocných

První soubor pacientů tvořilo 124 pacientů s diagnózou kolorektálního karcinomu, kteří byli v letech 2016 – 2018 operováni na chirurgické klinice Fakultní nemocnice v Plzni. Náběry krve byly prováděny předoperačně a před zahájením jakékoliv léčby. V tomto souboru pacientů byla zastoupena stadia I, II. Věková charakteristika je uvedena v Tabulce 10.

Dalším hodnoceným souborem byl soubor pacientů s kolorektálním karcinomem ve stadiu IV s metastázami v játrech. Náběry byly prováděny v době zjištění diagnózy před následným chirurgickým řešením a pak 3 – 5 dní po operaci. Věková charakteristika je uvedena v Tabulce 10.

Tabulka 10: Věková charakteristika skupin pacientů a probandů, kteří vstoupili do studie

Skupina	Počet	Věk			p-Value věk
		Medián	Minimum	Maximum	
Kontrolní	365	60,2	29	76	NS
KK I, II	124	66,4	32	86	
KK + meta	95	63,2	31	87	

Legenda: KK I, II, II – pacienti s kolorektálním karcinomem stadium I, II; KK + meta - pacienti s kolorektálním karcinomem stadium IV s metastázami do jater

6.5 Použité statistické metody

Vyhodnocení dat bylo provedeno ve spolupráci se statistikem. Pro statistické výpočty byl použit software SAS 9.4 (Statistical Analysis Software release 9.4; SAS Institute Inc., USA). U hodnocených souborů byly spočítány deskriptivní statistiky pro všechny hodnocené skupiny pacientů. Dále ve výsledcích jsou uvedeny následující parametry: aritmetický průměr, medián, minimum a maximum. Porovnání mezi skupinami pacientů bylo provedeno vzhledem k negaussovskému rozdělení hodnot neparametrickým Wilcoxonovým rank sum testem. Párové porovnání hodnot před a po operací pak jednovýběrovým Wilcoxonovým signed rank testem. Všechny provedené testy byly oboustranné, statistickou významnost značila p-hodnota <0.05 .

7 VÝSLEDKY

7.1 Hladiny markeru FGF 23 v plazmě u 366 probandů kontrolní skupiny

Tabulka 11: Hladiny markeru FGF 23 v plazmě probandů kontrolní skupiny

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
1	486	38,93
2	69011	56,31
3	69022	85,08
4	69024	72,47
5	69029	64,48
6	69031	106,7
7	69032	74,21
8	69038	69,55
9	69040	66,44
10	69041	71,15
11	69044	59,76
12	69045	75,59
13	69049	97,52
14	69050	77,23
15	69051	65,73
16	69053	93,02
17	69055	75,27
18	69058	61,16
19	69063	56,2
20	69065	68,93
21	69066	96,04
22	69068	58,89
23	69069	72,22
24	69071	61,31
25	69077	86,38
26	69079	96,03
27	69080	37
28	69081	93,17
29	69082	47,07
30	69083	78,21
31	69084	92,31
32	69086	54,91
33	69088	91,42
34	69090	75,58
35	69091	28,84

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
36	69093	89,72
37	69095	70,55
38	69097	186,1
39	69098	80,66
40	69102	79,78
41	69103	84,34
42	69104	60,04
43	69105	77,72
44	69106	77,94
45	69110	92,08
46	69113	70,76
47	69114	72,16
48	69120	86,57
49	69123	91,29
50	69124	99,9
51	69125	79,27
52	69126	90,62
53	69128	88,52
54	69133	63,39
55	69134	77,61
56	69138	94,03
57	69140	53,16
58	69141	68,55
59	69145	49,15
60	69149	71,35
61	69152	82,63
62	69161	108,4
63	69170	69,04
64	69175	65,37
65	69176	65,52
66	69178	78,73
67	69182	77,06
68	69184	98,88
69	69186	69,96
70	69189	96,66

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
71	69190	54,01
72	69192	75,36
73	69194	75,42
74	69195	74,34
75	69197	82,9
76	69198	77,49
77	69202	57,59
78	69205	92,38
79	69208	69,93
80	69210	85,07
81	69214	44,94
82	69217	71,74
83	69218	43,68
84	69221	45,07
85	69222	58,24
86	69223	58,54
87	69225	46,68
88	69228	43,93
89	69229	52,85
90	69230	69,83
91	69234	75,04
92	69236	82,92
93	69237	52,08
94	69238	60,22
95	69240	62,77
96	69242	73,65
97	69244	49,61
98	69246	48,64
99	69247	98,52
100	69254	51,46
101	69264	72,04
102	69265	64,58
103	69266	57,48
104	69267	50,66
105	69269	93,17
106	69270	82,56
107	69280	82,67
108	69281	57,32
109	69282	31
110	69283	41,47

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
111	69286	54,37
112	69290	53,9
113	69293	61,62
114	69294	71,74
115	69295	80,6
116	69299	55,82
117	69300	34,3
118	69302	67,06
119	69303	68,82
120	69304	34,3
121	69305	57,48
122	69308	66,52
123	69309	44,31
124	69310	54,62
125	69312	61,69
126	69313	72,05
127	69314	66,56
128	69315	61,28
129	69318	74,24
130	69319	69,06
131	69320	61,51
132	69322	67,86
133	69323	62,32
134	69324	86,5
135	69325	74,19
136	69327	76,72
137	69331	69,76
138	69332	76,4
139	69334	96,68
140	69336	55,32
141	69338	54,24
142	69339	37,84
143	69341	98,53
144	69342	74,2
145	69343	51,3
146	69348	39,69
147	69351	66,25
148	69354	50,83
149	69358	57,06
150	69362	69,13

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
151	69363	48,24
152	69364	75,93
153	69366	74,12
154	69369	75,93
155	69371	26,37
156	69372	66,62
157	69379	76,28
158	69381	52,47
159	69383	50,26
160	69384	49,35
161	69385	35,22
162	69386	25,85
163	69387	81,01
164	69388	63,79
165	69390	59,37
166	69391	79,83
167	69392	28,84
168	69393	39,69
169	69394	102,9
170	69396	74,19
171	69397	50,82
172	69400	56,82
173	69438	62,25
174	69446	99,14
175	69450	51,28
176	69454	53,64
177	69459	28,85
178	69462	72,52
179	69463	85,8
180	69464	83,27
181	69465	33,86
182	69467	53,18
183	69469	56,26
184	69472	62,36
185	69473	65,8
186	69477	81,8
187	69481	89,92
188	69486	81,16
189	69487	68,86
190	69490	52,17

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
191	69499	57,33
192	69500	83,14
193	69504	83,63
194	69505	55,69
195	69506	80,75
196	69507	65,14
197	69513	72,53
198	69517	53,36
199	69518	76,16
200	69519	76,43
201	69521	89,69
202	69522	63,8
203	69525	57,04
204	69526	85,53
205	69528	85,62
206	69533	87,28
207	69535	54,87
208	69541	36,78
209	69545	43,67
210	69547	99,24
211	69550	74,79
212	69551	76,44
213	69557	76,72
214	69560	59,81
215	69563	82,74
216	69567	76,82
217	69568	88,03
218	69570	76,54
219	69571	58,75
220	69574	71,27
221	69404	60,63
222	69405	60,89
223	69406	64,75
224	69407	89,66
225	69411	81,08
226	69412	36,74
227	69416	60,69
228	69418	41,41
229	69419	71,31
230	69422	60,39

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
231	69426	70,55
232	69427	81,79
233	69429	67,62
234	69431	92,88
235	69432	95,35
236	69436	85
237	69576	85,99
238	69577	76,6
239	69578	105,7
240	69586	89,97
241	69590	95,17
242	69593	87,21
243	69594	90,6
244	69618	54,77
245	965001	60,1
246	965005	84,95
247	965011	81,09
248	965021	84,84
249	965024	87,92
250	965025	64,84
251	965030	67,17
252	965031	85,76
253	965033	51,91
254	965035	53,18
255	965036	99,97
256	965038	82,57
257	965041	71,29
258	965043	77,12
259	965046	80,5
260	965048	55,9
261	965049	33,84
262	965052	86,29
263	965053	48,58
264	965056	83,46
265	965057	87,09
266	965061	57,55
267	2	77,13
268	5	98,55
269	9	61,93
270	11	66,62

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
271	13	75,5
272	14	57,26
273	20	67,42
274	31	51,65
275	48	50,56
276	51	123,1
277	60	28,42
278	61	M.M.
279	64	51,11
280	65	37
281	68	97,72
282	69	92,37
283	80	79,83
284	86	110,7
285	88	58,16
286	90	100,1
287	92	122,3
288	93	49,12
289	94	96,76
290	95	74,16
291	98	81,12
292	100	60,45
293	103	63,73
294	104	88,06
295	108	84,13
296	111	46,41
297	118	54,94
298	121	67,96
299	126	68,96
300	130	55,24
301	134	81,93
302	156	47,51
303	165	49,04
304	170	66,23
305	171	82,57
306	176	107,3
307	191	63,59
308	195	83,46
309	199	78,54
310	202	68,2

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
311	203	53,89
312	208	120,1
313	210	78,8
314	213	128,5
315	214	101,5
316	217	57,92
317	223	50,54
318	227	82,44
319	230	71,76
320	237	98,49
321	244	70,04
322	248	62,03
323	257	74,57
324	259	56,74
325	260	129
326	263	89,16
327	265	48,07
328	270	67,83
329	274	68,48
330	275	451,2
331	276	82,67
332	278	95,1
333	280	67,73
334	282	70,69
335	283	69,66
336	284	49,9
337	285	68,4
338	290	113,9

Číslo vzorku	ID VZORKU	FGF 23 pg/ml
339	294	80,46
340	296	72,05
341	298	65,76
342	299	64,14
343	311	85,51
344	314	50,12
345	320	68,9
346	323	78,52
347	324	93,69
348	328	70,77
349	329	78,07
350	334	55,94
351	338	78,84
352	343	79,96
353	353	92,53
354	358	100
355	362	73,86
356	366	83,62
357	384	82,99
358	392	96,44
359	395	160,6
360	397	94
361	398	77,83
362	403	82,36
363	435	87,68
364	436	27,9
365	442	129,9
366	467	80,56

Hladiny markeru FGF 23 v plazmě probandů kontrolní skupiny byly použity pro výpočet referenčních hodnot.

7.2 Hladiny markeru FGF 23 v plazmě pacientů s kolorektálním karcinomem

Tabulka 12: Hladiny markeru FGF 23 v plazmě pacientů s kolorektálním karcinomem

Číslo vzorku	Datum odběru	Věk	CEA ng/ml	CA 19 U/ml	TPS IU/l	FGF23 pg/ml
1	2.11.2015	74	4,3	16	93	106,7
2	4.11.2015	83	14,3	1	243	20,89
3	4.11.2015	62	138,8	1	335	156,5
4	4.11.2015	46	2	13	85	46,35
5	9.11.2015	59	1,5	173	328	72,18
6	13.11.2015	62	4,2	3	59	81,78
7	13.11.2015	87	7,9	13	91	158
8	16.11.2015	70	5,1	24	60	97,57
9	19.11.2015	62	3,5	21	55	77,73
10	4.12.2015	83	1,4	73	83	54,13
11	8.12.2015	57	2,1	25	226	98,58
12	10.12.2015	84	1,3	7	86	79,44
13	14.12.2015	59	1,3	440	160	74,88
14	18.12.2015	58	1,3	3	93	100,3
15	30.12.2015	70	3,8	9	169	58,09
16	6.1.2016	76	1,5	5	222	99,26
17	6.1.2016	61	1,7	4	136	67,61
18	11.1.2016	53	0,8	7	219	88,49
19	19.1.2016	67	1,2	8	87	60,09
20	22.1.2016	62	0,9	1	107	50,92
21	26.1.2016	58	4,3	3	45	89,89
22	1.2.2016	78	13,7	1	178	138,9
23	1.2.2016	65	3,9	6	642	93,48
24	11.2.2016	68	2,1	29	60	47,62
25	11.2.2016	67	3,5	9	21	37,54
26	17.2.2016	75	0,9	13	375	50,6
27	19.2.2016	75	3,4	15	228	106,3
28	22.2.2016	72	18,9	49	37	51,97
29	23.2.2016	87	6,4	1	20	68,18
30	24.2.2016	69	2,3	7	56	42,84
31	7.3.2016	79	1,6	7	609	54,43
32	14.3.2016	56	0,5	5	211	67,06
33	18.3.2016	72	8,5	67	212	119,8
34	21.3.2016	77	5	54	100	98,74
35	8.4.2016	63	3,6	28	330	73,25

Číslo vzorku	Datum odběru	Věk	CEA ng/ml	CA 19 U/ml	TPS IU/l	FGF23 pg/ml
36	11.4.2016	71	2,3	7	96	65,43
37	11.4.2016	62	12,3	11	109	73,12
38	12.4.2016	52	4,2	1	179	87,87
39	14.4.2016	60	0,9	15	37	91,62
40	18.4.2016	50	1,4	4	73	44,61
41	18.4.2016	76	95,5	33	734	35,55
42	22.4.2016	70	24,6	1900	854	44,87
43	28.4.2016	68	3,8	15	58	68,32
44	3.5.2016	67	1,5	4	67	62,12
45	3.5.2016	80	1,8	6	84	52,85
46	6.5.2016	84	189,2	194	185	62,1
47	9.5.2016	31	1,6	6	48	63,37
48	9.5.2016	75	1,1	6	96	55,83
49	9.5.2016	65	1,7	1	58	64,56
50	12.5.2016	40	0,8	4	156	98,71
51	13.5.2016	68	2,9	34	97	59,98
52	16.5.2016	60	1	3	94	80,67
53	16.5.2016	79	2	11	75	74,55
54	18.5.2016	62	3,8	4	77	55,04
55	26.5.2016	75	2,1	1900	78	51,27
56	27.5.2016	54	2,6	9	77	63,45
57	3.6.2016	75	15,9	1	280	36,1
58	14.6.2016	50	3,4	19	102	62,78
59	14.6.2016	50	1,4	14	87	69,99
60	16.6.2016	41	0,9	4	165	66,49
61	16.6.2016	39	0,6	4	69	81,5
62	16.6.2016	45	1,5	3	79	51,34
63	29.6.2016	79	2,1	12	76	85,77
64	12.8.2016	68	5,2	1	79	89,93
65	22.8.2016	50	98,6	34	68	37,83
66	22.9.2016	39	1,6	5	36	
67	20.10.2016	70	0,4	8	100	65,92
68	4.11.2016	67	1,2	10	191	103
69	4.11.2016	68	11,9	33	88	70,15
70	11.11.2016	65	2,8	6	42	123,5
71	6.12.2016	44	0,8	4	122	90,32
72	28.12.2016	54	1,6	5	67	57,49
73	2.1.2017	62	10,6	16	105	41,69
74	4.1.2017	35	3,6	1	126	29,91
75	26.1.2017	75	3,6	6	290	30,69

Číslo vzorku	Datum odběru	Věk	CEA ng/ml	CA 19 U/ml	TPS IU/l	FGF23 pg/ml
76	2.2.2017	80	345,1	1900	368	99,05
77	3.2.2017	44	1,1	3	30	61,29
78	13.2.2017	59	3,2	14	183	67,79
79	23.2.2017	78	1	16	32	88,71
80	12.4.2017	71	0,7	5	50	42,18
81	18.4.2017	81	40,9	1900	976	43,09
82	24.4.2017	68	0,8	7	29	58,55
83	2.5.2017	78	8	34	157	88,37
84	5.5.2017	65	1	4	454	65,33
85	11.5.2017	64	5,5	3	59	82,41
86	18.5.2017	68	1,5	9	95	122,7
87	23.5.2017	70	1,2	5	36	114,3
88	26.5.2017	52	1,2	17	256	89,56
89	30.5.2017	72	1,7	17	31	107,9
90	9.6.2017	75	4,8	13	93	139,7
91	14.6.2017	73	25,7	16	27	71,52
92	16.6.2017	77	7,4	1	27	133
93	16.6.2017	70	3,8	3	39	67,08
94	29.6.2017	69	0,4	6	70	89,49
95	4.7.2017	65	4,5	6	43	80,54
96	13.7.2017	72	8,4	8	83	81,13
97	18.7.2017	67	5,8	9	43	58,06
98	24.7.2017	52	0,6	6	81	80,95
99	25.7.2017	57	3	6	2	66,32
100	11.8.2017	68	2,5	1	33	36,61
101	6.9.2017	73	0,9	6	30	74,73
102	7.9.2017	76	2,1	18	38	78,5
103	15.9.2017	76	6,4	16	36	81,4
104	26.9.2017	68	1,7	31	49	60,37
105	29.9.2017	70	2	16	260	75,48
106	2.10.2017	71	1,2	14	40	53,55
107	3.10.2017	65	6,2	14	100	79,6
108	4.10.2017	69	339,8	2198	310	82,52
109	4.10.2017	67	3,2	9	56	50,03
110	26.10.2017	68	7	8	47	66,67
111	21.11.2017	78	2,3	16	28	79,38
112	23.11.2017	70	2,3	1	53	55,52
113	24.11.2017	82	1,9	1	49	55,59
114	27.11.2017	72	2,7	43	52	42,37
115	29.11.2017	66	1,4	6	18	58,52
116	30.11.2017	73	3,9	19	74	64,68
117	29.12.2017	76	2,4	208	35	68,63

Hladiny FGF 23 byly použity pro statistické vypodnocení jak je uvedeno v další kapitole.

7.3 Hladiny markeru FGF 23 v plazmě pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu

Tabulka 13: Hladiny markeru FGF 23 v plazmě pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu

Číslo vzorku	Datum odběru	Věk	Stav	CEA ng/ml	CA 19-9 U/ml	TPA IU/l	TPS IU/l	FGF23 pg/ml
1	11.5.2017	71	před operací	15,8	14	69	67	55,4
2	19.5.2017	71	po operaci	7,5	11	62	85	43,6
3	11.7.2017	71	před operací	189	15	58	56	57,7
4	4.10.2017	76	před operací	40,7	18	189	124	89,5
5	20.12.2017	73	před operací	1	9	44	46	52
6	27.12.2017	73	po operaci	0,8	12	210	234	42,2
7	4.1.2018	74	před operací	1,6	13	43	34	70,5
8	4.4.2017	57	před operací	1,8	1	76	24	62,2
9	20.9.2017	71	před operací	1,9	50	159	198	67,4
10	25.9.2017	71	po operaci	1	90	165	117	73,8
11	15.1.2018	32	před operací	0,9	2	41	24	55
12	19.1.2018	32	po operaci	0,6	3	98	119	46,4
13	12.4.2017	56	před operací	4,2	25	26	14	60,4
14	18.4.2017	56	po operaci	2,8	30	62	79	45,6
15	31.1.2018	73	před operací	8,4	63	178	136	79,6
16	20.6.2017	64	před operací	46,9	102	53	47	52,4
17	23.6.2017	64	po operaci	16,2	51	120	118	25,3
18	15.11.2017	79	před operací	4,8	42	208	92	66,4
19	12.10.2017	41	po operaci	25,7	38	153	197	79,4
20	7.11.2017	41	před operací	44,1	72	168	146	103
21	14.11.2017	41	po operaci	7,8	28	154	252	98,3
22	25.8.2017	62	před operací	6,4	13	73	60	51,8
23	5.9.2017	62	před operací	3	37	344	272	115,3
24	22.1.2018	65	před operací	2	2	70	18	57,1
25	26.1.2018	65	po operaci	1,9	3	183	49	59,2
26	16.10.2017	68	před operací	5,2	17	100	67	113,3
27	23.10.2017	68	po operaci	3	13	222	351	90,5
28	14.11.2017	54	před operací	0,9	14	81	62	72,6
29	27.11.2017	54	po operaci	0,8	43	68	52	40,9
30	7.9.2017	66	před operací	16,5	21	1082	922	58,6
31	2.8.2017	47	před operací	0,6	5	89	85	49,4
32	11.9.2017	80	před operací	5,9	63	141	102	42,8
33	15.9.2017	80	po operaci	4,5	93	178	202	36,6
34	26.10.2017	70	před operací	6,6	13	137	81	124,8
35	1.11.2017	70	po operaci, jiná Dg	0,9	9	M.M.	80	75,4

Číslo vzorku	Datum odběru	Věk	Stav	CEA ng/ml	CA 19-9 U/ml	TPA IU/l	TPS IU/l	FGF23 pg/ml
36	6.11.2017	49	před operací	0,6	9	26	31	93,2
37	13.11.2017	49	po operaci	0,6	10	66	67	96,8
38	11.1.2018	44	před operací	0,8	15	91	207	56
39	15.1.2018	44	po operaci	0,8	20	208	401	33,4
40	27.6.2017	74	před operací	0,8	6	110	110	43,1
41	3.7.2017	74	po operaci	0,5	23	190	338	53,5
42	23.8.2017	68	před operací	9,4	29	39	24	58,4
43	29.8.2017	68	po operaci	3,3	33	165	174	31,5
44	7.8.2017	48	před operací	4,2	9	15	24	49,4
45	11.8.2017	48	po operaci	3,1	16	86	137	20,9
46	2.10.2017	68	před operací	2,6	21	102	57	63,6
47	6.10.2017	68	po operaci	1,1	20	62	77	39,6
48	6.12.2017	70	před operací	4,7	1	398	290	63,9
49	11.12.2017	70	po operaci	1,4	2	154	243	58,3
50	15.5.2017	75	před operací	13,9	221	131	224	50,6
51	5.9.2017	53	před operací	31,2	176	1241	370	62,5
52	31.10.2017	72	před operací	114,6	1	187	68	66,1
53	8.6.2017	60	před operací	11,3	1	63	69	41,6
54	12.6.2017	60	po operaci, jiná Dg	11,5	1	251	175	24,4
55	7.11.2017	60	před operací	1,7	5	41	23	87,6
56	13.11.2017	60	po operaci	0,7	4	47	46	68,4
57	7.9.2017	63	před operací	49	239	62	32	68,9
58	13.9.2017	63	po operaci	28,6	107	69	68	66,2
59	19.10.2017	63	před operací	57	108	80	40	82,1
60	23.10.2017	63	po operaci	109,9	176	131	60	84,2
61	28.6.2017	69	před operací	1,5	11	128	92	44,7
62	20.4.2017	36	před operací	22,2	253	199	282	40,7
63	24.4.2017	36	po operaci	17,5	229	150	252	32,4
64	17.7.2017	42	před operací	3,8	24	167	37	56,8
65	26.7.2017	42	po operaci	0,4	5	81	126	26
66	14.7.2017	60	před operací	3	9	134	106	80
67	21.7.2017	60	po operaci	1,1	22	322	442	95,7
68	13.12.2017	78	před operací	59,5	527	126	M.M.	97
69	20.12.2017	78	po operaci	6,8	128	116	141	93
70	6.11.2017	73	před operací	1,8	26	130	179	74,5
71	13.11.2017	73	po operaci	1,3	50	226	187	39,6
72	1.8.2017	70	před operací	900	181	2274	803	33,6
73	4.8.2017	70	po operaci	900	177	2153	819	43,1
74	11.9.2017	73	před operací	4,1	30	76	63	171,2
75	20.9.2017	73	po operaci	2,3	22	139	182	114,2

Číslo vzorku	Datum odběru	Věk	Stav	CEA ng/ml	CA 19-9 U/ml	TPA IU/l	TPS IU/l	FGF23 pg/ml
76	25.9.2017	68	před operací	116,9	131	113	176	68,5
77	29.9.2017	68	po operaci	47,5	81	177	129	77,7
78	21.7.2017	79	před operací	3,2	32	74	98	72,8
79	8.11.2017	71	před operací	2,6	93	137	108	70,9
80	13.11.2017	71	po operaci	1,9	105	131	211	47,1
81	10.5.2017	55	před operací	9,4	46	79	54	73,9
82	18.5.2017	55	po operaci	5,8	73	68	47	53,2
83	22.5.2017	52	před operací	0,7	8	31	23	36,3
84	29.5.2017	52	po operaci	0,5	8	33	60	67,6
85	21.12.2017	54	před operací	1,5	37	155	95	60,6
86	27.12.2017	54	po operaci	1,2	13	45	46	48,8
87	4.9.2017	44	před operací	1	2	47	32	49,2
88	8.9.2017	44	po operaci	0,8	13	205	323	46,2
89	10.1.2018	46	před operací	900	16	2055	687	38,6
90	17.1.2018	46	po operaci	615,8	17	336	467	56,7
91	4.8.2017	65	před operací	1,8	17	80	159	62,2
92	9.8.2017	65	po operaci	1,1	34	197	239	44,2
93	27.4.2017	75	před operací	22,2	11	54	17	181,9
94	15.1.2018	32	před operací	1	5	78	137	55,6
95	18.1.2018	32	po operaci	0,9	3	72	119	25,4
96	19.6.2017	56	po operaci	16,9	32	402	152	48,5
97	26.6.2017	56	po operaci	0,9	6	74	73	84
98	13.12.2017	51	před operací	1,7	3	93	104	97,1
99	18.12.2017	51	po operaci	1,6	9	415	598	90,5
100	24.5.2017	62	před operací	12,1	92	140	93	51,9
101	2.6.2017	62	po operaci	1,8	18	75	121,3	41
102	16.5.2017	67	před operací	2,5	23	85	55	22,9
103	12.4.2017	73	před operací	4,7	240	121	50	61,4
104	19.4.2017	73	po operaci	1,7	35	204	264	81,3
105	18.1.2018	86	před operací	4,6	5	74	36	60
106	22.1.2018	86	po operaci	2,4	5	104	68	51,7
107	24.5.2017	44	před operací	1,2	8	16	10	40,6
108	29.5.2017	44	po operaci	0,8	10	40	31	72,5
109	21.8.2017	68	před operací	1,6	10	172	254	41,7
110	25.8.2017	68	po operaci	1,4	16	133	180	19,9
111	20.9.2017	54	před operací	0,9	1	25	51	63,3
112	25.9.2017	54	po operaci	0,6	1	67	80	58,4
113	28.7.2017	69	před operací	21,6	17	63	25	72,9
114	1.8.2017	69	po operaci	12,8	40	60	30	71,5
115	6.4.2017	58	před operací	3	42	68	49	91,2

Číslo vzorku	Datum odběru	Věk	Stav	CEA ng/ml	CA 19-9 U/ml	TPA IU/l	TPS IU/l	FGF23 pg/ml
116	13.4.2017	58	po operaci	2,1	53	72	85	91,1
117	23.5.2017	58	před operací	2,6	53	104	147	92,1
118	8.6.2017	58	po operaci	2,3	26	76	71	80,1
119	26.7.2017	54	před operací	0,8	7	58	79	59,2
120	19.7.2017	57	před operací	77,1	101	120	38	35,2
121	26.7.2017	57	po operaci	12,4	24	122	127	53,34
122	11.12.2017	55	před operací	1	22	99	94	58,7
123	18.12.2017	55	po operaci	0,7	24	141	193	50,3
124	13.4.2017	66	před operací	6,8	59	94	127	61,7
125	20.4.2017	66	po operaci	1,2	19	245	454	42,7
126	10.10.2017	78	před operací	2,1	25	91	192	124,9
127	12.10.2017	78	po operaci	2	28	149	291	99,9
128	18.8.2017	71	před operací	3,7	1	1502	2400	47,5
129	25.8.2017	71	po operaci	3,8	1	254	275	38,6
130	2.11.2017	72	před operací	0,7	7	131	69	70,3
131	21.11.2017	72	po operaci	0,7	7	133	78	44,2
132	7.12.2017	72	před operací	0,7	4	147	113	49,6
133	13.12.2017	72	po operaci	1,3	34	378	166	53,9
134	14.12.2017	68	před operací	183,6	19	245	201	101,6
135	18.12.2017	68	po operaci	159,2	21	217	107	76,8
136	29.6.2017	71	před operací	23,8	243	95	48	41,4
137	4.7.2017	71	po operaci, jiná Dg	16,9	181	205	97	45,4
138	20.11.2017	67	před operací	14,6	47	88	94	38,1
139	27.11.2017	67	po operaci	12,7	44	143	112	34,4
141	5.9.2017	78	před operací	1	18	93	84	72,7
141	12.9.2017	78	po operaci	0,7	22	165	225	93,9
142	10.4.2017	67	před operací	1,3	2	22	27	30,4
143	29.11.2017	77	před operací	4,5	55	820	494	43,8
144	4.12.2017	77	po operaci	4,5	55	820	494	26,4
145	18.5.2017	65	před operací	1,2	8	78	118	51,5
146	11.9.2017	73	před operací	1,6	13	141	99	42,8
147	15.9.2017	73	po operaci	1,5	21	138	165	39,9
148	4.9.2017	82	před operací	89,6	43	473	161	45,3
149	25.10.2017	57	před operací	20	569	155	124	74,3
150	2.11.2017	57	po operaci	5,4	118	63	107	74,7
151	20.11.2017	51	před operací	167,7	37	56	41	80
152	23.11.2017	51	po operaci	58,6	23	52	61	30,2
153	6.12.2017	58	před operací	1,1	674	25	44	53,8
154	8.12.2017	58	po operaci	1,1	225	145	188	52
155	9.8.2017	68	před operací	8,9	12	57	33	45,8

Číslo vzorku	Datum odběru	Věk	Stav	CEA ng/ml	CA 19-9 U/ml	TPA IU/l	TPS IU/l	FGF23 pg/ml
156	11.8.2017	68	po operaci	5,8	15	176	145	20,8
157	2.5.2017	54	před operací	6,1	305	76	13	45,4
158	19.6.2017	54	po operaci	1,2	32	91	101	64,5
159	22.11.2017	54	před operací	26	3525	931	196	39,8
160	27.11.2017	54	po operaci	57	3975	1614	386	33,6
161	12.12.2017	62	před operací	2,8	21	107	113	62,3
162	21.12.2017	62	po operaci	1,5	35	229	209	85,8
163	25.4.2017	64	před operací	24	5	507	154	38,9
164	5.5.2017	64	po operaci	4,5	16	261	295	31,9
165	18.12.2017	66	před operací	15,3	37	70	36	64,7
166	16.11.2017	70	před operací	2,4	41	50	62	32,7
167	20.11.2017	70	po operaci	1,4	39	54	38	20,9
168	12.6.2017	71	před operací	1,5	11	57	31	42,5
169	16.6.2017	71	po operaci	1,2	15	410	400	31,5
170	16.1.2018	45	před operací	11,7	12	189	189	101,1
171	19.1.2018	45	po operaci	10,7	12	131	114	43,6

Naměřené hladiny FGF 23 v plazmě byly použity pro porovnání a statistické vypodnocení mezi kontrolní skupinou, pacienty s kolorektálním karcinomem a pacienty s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu. Tyto výsledky jsou diskutovány v další kapitole.

8 DISKUZE

8.1 Referenční rozmezí FGF-23

Hodnoty kontrolní skupiny byly posloužily k výpočtu referenčních hodnot pro FGF-23. Referenční hodnoty FGF-23 byly stanoveny v rozmezí 30 – 105 pg/mL. Metodika výpočtu byla 95% interval.

V návodu k soupravě LIAISON FGF-23 jsou uvedeny výsledky od soboru 910 osob, které měli medián 57,5 pg/mL a rozmezí 23,2–95,4 pg/mL. Lze tedy konstatovat, že výsledky jsou v souladu s rozmezím udávaným výrobcem. Výrobce vždy doporučuje provést vlastní stanovení rozsahu předpokládaných hodnot pro vyšetřovanou populaci. Toto bylo učiněno na reprezentativním vzorku 366 probandů.

Při snaze porovnat naše hodnoty u kontrolní skupiny s výsledky zdravých osob jsme v literatuře narazili na dva problémy. Prvním bylo, že většina publikovaných výsledků je prováděna nejrůznějšími typy ELISA souprav a jen několik málo prací bylo provedeno chemiluminiscencí. Druhým závažným problémem bylo, že počty kontrolních skupin zdravých osob se pohybovaly od 5 do maximum 90 osob. V pracích byly uváděny u zdravých osob průměrné hodnoty, které se pohybovaly od 45 do 95 pg/ml. (Seifert, 2016; Pedersen, 2013; Urena-Torres, 2014; Shimizu, 2012)

8.2 Porovnání hladin FGF-23 kontrolní skupiny a pacientů v různých stadiích onemocnění kolorektálním karcinomem

U nemocných s kolorektálním karcinomem ve stadiu I a II jsme neprokázali žádný statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou. Naproti tomu u skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem, kde byly přítomny metastázy, byl signifikantní pokles hodnot FGF 23.

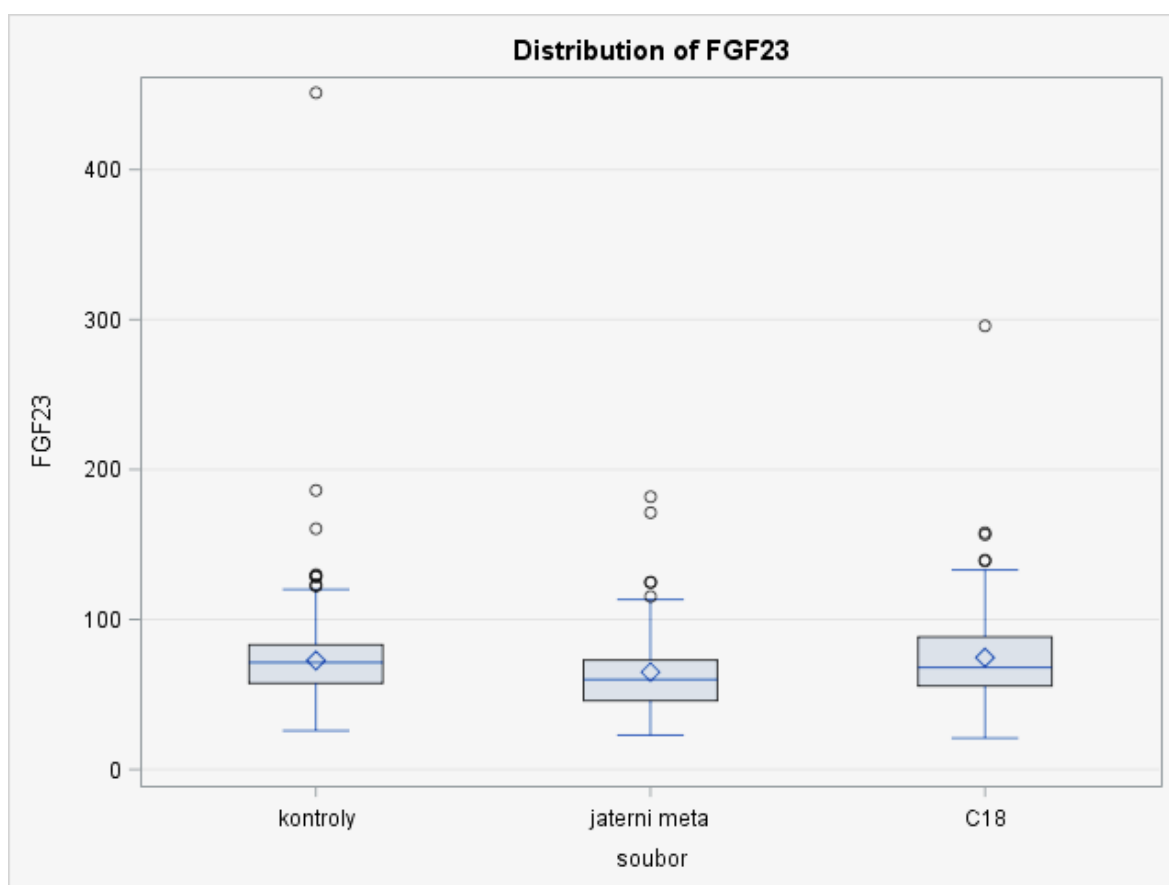
Tabulka 13 shrnuje výsledky FGF-23 u tří sledovaných skupin, včetně statisticky vyhodnocených rozdílů mezi nimi. Pro jednodušší porovnání je uvedeno i vyhodnocení v grafické podobě (Graf 1).

Tabulka 14: Hodnoty FGF 23 u posuzovaných skupin

Soubor	N	Průměr	Median	Min - Max	p-Value 1	p-Value 2
Kontroly	365	72.5	71.31	26.8 – 451.2	-	
KK I, II	124	74.6	67.99	20.8 -295.8	p=0.8599	p=0.0028
KK + meta	95	64.8	60.00	22.9 – 181.9	p<0.0001	

Legenda: KK I, II, II - pacienti s kolorektálním karcinodem stadium I, II; KK+meta - pacienti s kolorektálním karcinodem stadium IV s metastázami do jater

Graf 1: Rozložení hodnot koncentrací FGF 23 mezi kontrolní skupinou, pacienty s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu a pacienty s kolorektálním karcinodem



8.3 Porovnání hladin FGF 23 a rutinně používaných nádorových markerů

Mezi publikovanými pracemi existuje pouze jediná publikace, která se věnuje problematice vztahu hladin FGF 23 a kolorektálního adenomu. Autoři v této práci zjistili, že se zvyšující hladinou FGF 23 narůstá počet případů recidivujícího kolorektálního adenomu. (Jacobs 2011)

Naše naměřené hodnoty FGF 23 nejsou v souladu s výsledky Jacobs et al. 2011 v tom smyslu, že jsme nezaznamenali statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a pacienty s kolorektálním karcinomem a pacienty s kolorektálním karcinomem a jaterními metastázami což jsme na základě výsledků Jacobs et al. 2011 očekávali. Na druhé straně, v našem souboru nemocných s kolorektálním karcinomem ve velice časném stadiu byl také medián sérových hladin onkofetálních i cytokeratinových markerů byl v mezích normy. FGF 23 bylo korelováno s ostatními sledovanými biomarkery stanovenými z předoperačních náběrů u pacientů s kolorektálním karcinomem ve stadiu I, II. Naměřené hodnoty všech biomarkerů uvádí Tabulka 14. Žádná statisticky signifikantní korelace však nebyla nalezena. Hodnoty korelací jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15: Předoperační hodnoty biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia I, II

Biomarker	Před operací		
	Median	Minimum	Maximum
FGF 23	67.9	20.8	295.8
CEA	2.1	0.2	2572
CA 19-9	8.0	0.8	19000
TPA	104	5	2642
TPS	80	1	976

Tabulka 16: Korelace předoperačních hodnot biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia I, II

Biomarker				
Spearmanův korelační koeficient				
Statistická významnost				
	CEA	CA19-9	TPA	TPS
FGF 23	0.03306	0.02111	0.05315	0.06494
	0.7155	0.8182	0.5693	0.4754

Hladiny FGF 23 byly dále korelovány s ostatními sledovanými biomarkery stanovenými z předoperačních náběrů další vyšetřované skupiny, pacientů s kolorektálním karcinomem ve stadiu IV s jaterními metastázami. Hodnoty všech biomarkerů uvádí Tabulka 16. Ani zde nebyla nalezena statisticky signifikantní korelace (Tabulka 17).

Tabulka 17: Předoperační hodnoty biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia IV s jaterními metastázami

Biomarker	Před operací		
	Median	Minimum	Maximum
FGF 23	60.0	22.9	181.9
CEA	4.2	0.6	900
CA 19-9	19.0	1.0	3525
TPA	93.0	15	2274
TPS	82.5	10	2400

Tabulka 18: Korelace předoperačních hodnot biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia IV s jaterními metastázami

Biomarker				
Spearmanův korelační koeficient				
Statistická významnost				
	CEA	CA19-9	TPA	TPS
FGF 23	0.08016	0.07825	0.03281	0.03015
	0.4400	0.4510	0.7523	0.7730

U nemocných s metastatickým procesem do jater byly stanoveny hladiny nádorových markerů před chirurgickým zákrokem a po jeho provedení. Hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19: Hodnoty biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia IV a metastázami do jater před operací a po operaci

Biomarker	Před operací			Po operaci			p-Value
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	
FGF 23	60.0	22.9	181.9	50.30	19.9	114.2	p<0.0001
CEA	4.2	0.6	900	1.90	0.40	900	p<0.0001
CA 19-9	19.0	1.0	3525	23.00	1.0	3975	p=0.8311
TPA	93.0	15	2274	141.00	33	2153	p=0.0099
TPS	82.5	10	2400	141.00	30	819	p<0.0001

Při porovnání hladin FGF 23 stanovených před a po operaci pacientu s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu jsem zjistila statisticky významný pokles hodnot po operaci (p<0.0001).

Hladina CEA v souvislosti s odstraněním nádorové hmoty také statisticky signifikantně poklesla (p<0.0001). Hladiny oba cytokeratinových markerů (TPA, TPS) se signifikantně se zvýšily (p=0.0099, p<0.0001), což souvisí s okamžitým nastartováním

reparačních procesů po operaci a neinvazivním množení buněk. Pooperační hladina CA 19-9 zůstala v porovnání s předoperační hladinou beze změn, což je na první pohled překvapivé, protože biologický poločas pooperačních hodnot CA 19-9 je odhadován přibližně na 12h. (Yoshimasu, 1999). Někteří autoři však uvádějí falešně pozitivní hodnoty u obstrukčního ikteru (Ballehaninna, 2012). Z toho je možné dovodit, že hladiny CA 19-9 mohou být ovlivněny přímými zákroky na jaterním parenchymu a proto pooperační hladiny CA 19-9 u operací jaterních metastáz nebudou dobrým ukazatelem zdařilosti operačního zákroku. (Ballehaninna, 2012)

9 ZÁVĚRY

Zavedením stanovení biomarkeru FGF 23 a stanovením hladin ve všech zamýšlených skupinách pacientů se podařilo získat odpovědi na všechny definované výzkumné otázky.

Bylo zavedeno stanovení biomarkeru FGF 23 v plazmě metodou chemiluminiscence soupravou LIASON FGF 23 na přístroji LIAISON XL firmy DiaSorin. Dále jsem provedla stanovení hladin FGF 23 v normální populaci (kontrolní skupina) a provedla stanovení hladin u pacientů s kolorektálním karcinomem v různých stadiích. Výsledky FGF 23 pak byly porovnány s výsledky již zavedených nádorových markerů CEA, CA 19-9, TPA a TPS.

- 1) Referenční hodnoty FGF 23 pro vzorek zdravé populace jsem stanovila na 30 – 105 pg/mL.
- 2) U pacientů s kolorektálním karcinomem se mění hladina FGF 23 se stadii onemocnění. U pacientů ve stadiu I a II je medián FGF 23 hodnota 67.9 pg/mL, přičemž u pacientů ve stadiu IV s jaterními metastázami je medián FGF 23 hodnota 60.0 pg/mL. Tento rozdíl je statisticky významný ($p < 0.0001$).
- 3) Hladiny FGF 23 u pacientů s kolorektálním karcinomem stadia IV a metastázami do jater po operaci vykázaly statisticky signifikantní pokles v porovnání s hladinami pře operací.
- 4) Porovnáním hladin FGF 23 s ostatními nádorovými markery bylo zjištěno, že hodnoty FGF 23 nekorelují s žádným z dalších stanovovaných markerem (CEA, CA 19-9, TPA, TPS).
- 5) Dále jsem zjistila, že mediány hodnot FGF 23 u pacientů s nádorovým onemocněním se pohybují v rámci rozmezí referenčních hodnot. FGF 23 tedy nebude vhodný jako typický nádorový marker.

10 ZÁVĚRY PRO PRAXI

Z pilotní studie vyplývá, že biomarker FGF 23 dle získaných výsledků není vhodný jako nádorový marker pro klinickou praxi, je možné ho použít jako biomarker studia etiopatogeneze nádorového onemocnění.

Studium hladin FGF 23 bude vhodné rozšířit na rozsáhlejší soubor nádorových diagnóz při využití větších a přesně definovaných souborů pacientů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

ADAM, Zdeněk, Jana KOPTÍKOVÁ a Jiří VORLÍČEK. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Praha: Grada, 2003. ISBN 8024706776.

ALEKSANDROVA, Krasimira, Tobias PISCHON, Mazda JENAB, et al. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC Medicine* [online]. 2014, 12(1), - [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1186/s12916-014-0168-4. ISSN 1741-7015. Dostupné z: <http://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-014-0168-4>

BALLEHANINNA, U, R CHAMBERLAIN. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol* [online]. 2012, 3(2):105-19 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021. PubMed PMID: 22811878; PubMed Central PMCID:PMC3397644. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3397644/>

BALMANA, J., F. BALAGUER, A. CERVANTES a D. ARNOLD. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology* [online]. 2013, 24(suppl 6), vi73-vi80 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1093/annonc/mdt209. ISSN 0923-7534. Dostupné z: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdt209>

CINQUANTA, Luigi, Desré Ethel FONTANA a Nicola BIZZARO. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?. *Autoimmunity Highlights* [online]. 2017, 8(1), - [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1007/s13317-017-0097-2. ISSN 2038-0305. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13317-017-0097-2>

DAVIS, Donald M., Jorge E. MARCET, Jared C. FRATTINI, Andrew D. PRATHER, James J.L. MATEKA a Valentine N. NFONSAM. Is It Time to Lower the Recommended Screening Age for Colorectal Cancer?. *Journal of the American College of Surgeons* [online]. 2011, 213(3), 352-361 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2011.04.033. ISSN 10727515. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751511003802>

DUFFY, M. J., R. LAMERZ, C. HAGLUND, A. NICOLINI, M. KALOUSOVÁ, L. HOLUBEC a C. STURGEON. Tumor markers in colorectal cancer, gastric cancer and gastrointestinal stromal cancers: European group on tumor markers 2014 guidelines update. *International Journal of Cancer* [online]. 2014, 134(11), 2513-2522 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1002/ijc.28384. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28384>

EDGE, Stephen B. a Carolyn C. COMPTON. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology* [online]. 2010, 17(6), 1471-1474 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1245/s10434-010-0985-4. ISSN 1068-9265. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1245/s10434-010-0985-4>

FERLAY, J., E. STELIAROVA-FOUCHER, J. LORTET-TIEULENT, S. ROSSO, J.W.W. COEBERGH, H. COMBER, D. FORMAN a F. BRAY. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* [online]. 2013, 49(6), 1374-1403 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.12.027. ISSN 09598049. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804913000075>

FERLAY, Jacques, Isabelle SOERJOMATARAM, Rajesh DIKSHIT, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* [online]. 2015, 136(5), E359-E386 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1002/ijc.29210. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29210>

FIALA, Ondrej, Jindrich FINEK, Tomas BUCHLER, et al. The Association of Serum Carcinoembryonic Antigen, Carbohydrate Antigen 19-9, Thymidine Kinase, and Tissue Polypeptide Specific Antigen with Outcomes of Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Bevacizumab: a Retrospective Study. *Targeted Oncology* [online]. 2015, 10(4), 549-555 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1007/s11523-015-0365-x. ISSN 1776-2596. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11523-015-0365-x>

HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, 144(5), 646-674 [cit. 2018-03-28]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>

HANAHAN, Douglas, Robert A WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [online]. 2000, 100(1), 57-70 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400816839>

HENNINK, Simone D., Andrea E. VAN DER MEULEN-DE JONG, Ron WOLTERBEEK, et al. Randomized Comparison of Surveillance Intervals in Familial Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2015, 33(35), 4188-4193 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.2035. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2015.62.2035>

HOLUBEC, Luboš. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0636-9.

JABLONSKÁ, Markéta. *Kolorektální karcinom: časná diagnóza a prevence*. Praha: Grada, 2000. ISBN 807169777x.

JACOBS, Elizabeth, MariaElena MARTINEZ, Julie BUCKMEIER, Peter LANCE, Melissa MAY a Peter JURUTKA. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with increased risk for metachronous colorectal adenoma. *Journal of Carcinogenesis* [online]. 2011, 10(1), 3- [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.4103/1477-3163.76723. ISSN 1477-3163. Dostupné z: <http://www.carcinogenesis.com/text.asp?2011/10/1/3/76723>

JOHNSON, Constance M., Caimiao WEI, Joe E. ENSOR, Derek J. SMOLENSKI, Christopher I. AMOS, Bernard LEVIN a Donald A. BERRY. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes & Control* [online]. 2013, 24(6), 1207-1222 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1007/s10552-013-0201-5. ISSN 0957-5243. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10552-013-0201-5>

KAUŠITZ, Juraj, a kolektiv. *Nádorové markery*. Olomouc: SOLEN, 2014. ISBN 9788097134013

KRÁL, J., J. SLYŠKOVÁ, P. VODIČKA a J. ŠPIČÁK. Molekulární genetika kolorektálního karcinomu. *Klin Onkol* [online]. 2016, 29(6), 419-427 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/210/5095.pdf>

LEAF, David E., Renata C. PEREIRA, Hasan BAZARI a Harald JÜPPNER. Oncogenic Osteomalacia due to FGF23-Expressing Colon Adenocarcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2013, 98(3), 887-891 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1210/jc.2012-3473. ISSN 0021-972X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2012-3473>

LODISH, Harvey F. *Molecular cell biology*. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Co., 2013. ISBN 1-4292-3413-x.

METTANG, T, K KUNZMANN, H ROTH a E WEISSHAAR. Fibroblast Growth-factor 23 and Calcium-binding Proteins are not Associated with Chronic Itch in Patients on Haemodialysis. *Acta Dermato Venereologica* [online]. 2017, 97(3), 381-382 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.2340/00015555-2536. ISSN 0001-5555. Dostupné z: <https://www.medicaljournals.se/acta/content/abstract/10.2340/00015555-2536>

MOLINA, Rafael, Xavier FILELLA, J. M. AUGÉ a J. M. ESCUDERO. *Nádorové markery Roche: karcinom plic*. Praha: Roche, 2013

NICOLINI, Andrea, Paola FERRARI, Franca FULCERI, Angelo CARPI a Giuseppe ROSSI. An individual reference limit for ‘early’ diagnosis of metastatic breast cancer during postoperative follow-up. *Biomarkers in Medicine* [online]. 2015, 9(4), 307-317 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.2217/bmm.15.6. ISSN 1752-0363. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/bmm.15.6>

NOVOTNÝ, J., VÍTEK, P. (2012). *Onkologie v klinické praxi: standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů*. Praha: Mladá fronta. ISBN 9788020426635.

PEDERSEN, Lise, Susanne Møller PEDERSEN, Claus Lohman BRASEN a Lars Melholt RASMUSSEN. Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. *Clinical Biochemistry* [online]. 2013, 46(12), 1079-1083 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.05.046. ISSN 00099120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912013002427>

POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-494-2.

QUINTERO, Enrique, Marta CARRILLO, Maria-Liz LEOZ, et al. Risk of Advanced Neoplasia in First-Degree Relatives with Colorectal Cancer: A Large Multicenter Cross-Sectional Study. *PLOS Medicine* [online]. 2016, 13(5), e1002008- [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002008. ISSN 1549-1676. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002008>

RAPITI, Elisabetta, Gerald FIORETTA, Helena M. VERKOOIJEN, et al. Increased risk of colon cancer after external radiation therapy for prostate cancer. *International Journal of Cancer* [online]. 2008, 123(5), 1141-1145 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1002/ijc.23601. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.23601>

SEIFERT, Michael E., Isa F. ASHOOR, Myra L. CHIANG, et al. Fibroblast growth factor-23 and chronic allograft injury in pediatric renal transplant recipients: a Midwest Pediatric Nephrology Consortium study. *Pediatric Transplantation* [online]. 2016, 20(3), 378-387 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1111/ptr.12682. ISSN 13973142. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ptr.12682>

SHEFFER, M., M. D. BACOLOD, O. ZUK, et al. Association of survival and disease progression with chromosomal instability: A genomic exploration of colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, 106(17), 7131-7136 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1073/pnas.0902232106. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902232106>

SHIMIZU, Yuichiro, Seiji FUKUMOTO a Toshiro FUJITA. Evaluation of a new automated chemiluminescence immunoassay for FGF23. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* [online]. 2012, 30(2), 217-221 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1007/s00774-011-0306-4. ISSN 0914-8779. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00774-011-0306-4>

SCHMOLL, Hans-Joachim, Thomas CARTWRIGHT, Josep TABERNERO, et al. Phase III Trial of Capecitabine Plus Oxaliplatin As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: A Planned Safety Analysis in 1,864 Patients. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2006, 25(1), 102-109 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.1075. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2006.08.1075>

SIEGEL, Rebecca, Elizabeth WARD, Otis BRAWLEY a Ahmedin JEMAL. Cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2011, 61(4), 212-236 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.3322/caac.20121. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20121>

SOUBERBIELLE, Jean-Claude, Dominique PRIÉ, Marie-Liesse PIKETTY, Anya ROTHENBUHLER, Pierre DELANAYE, Philippe CHANSON a Etienne CAVALIER. Evaluation of a New Fully Automated Assay for Plasma Intact FGF23. *Calcified Tissue*

International [online]. 2017, 101(5), 510-518 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1007/s00223-017-0307-y. ISSN 0171-967X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00223-017-0307-y>

The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators. *J Clin Epidemiol* [online]. 1988;41(2),105-114 [cit. 2018-02-28]

UREÑA-TORRES, Pablo, Dominique PRIÉ, Karim KEDDAD, Peter PRESTON, Paul WILDE, Hong WAN a J Brian COPLEY. Changes in fibroblast growth factor 23 levels in normophosphatemic patients with chronic kidney disease stage 3 treated with lanthanum carbonate: results of the PREFECT study, a phase 2a, double blind, randomized, placebo-controlled trial. *BMC Nephrology* [online]. 2014, 15(1), [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1186/1471-2369-15-71. ISSN 1471-2369. Dostupné z: <http://bmcnephrol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2369-15-71>

VERVLOET, Marc G., Aaltje Y. ADEMA, Tobias E. LARSSON a Ziad A. MASSY. The Role of Klotho on Vascular Calcification and Endothelial Function in Chronic Kidney Disease. *Seminars in Nephrology* [online]. 2014, 34(6), 578-585 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2014.09.003. ISSN 02709295. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0270929514001430>

WILD, David. *The Immunoassay Handbook*. 3th ed. Oxford: Elsevier, 2005. ISBN 0080445868.

YOSHIMASU T, et al. Disappearance curves for tumor markers after resection of intrathoracic malignancies. *Int J Biol Markers* [online]. 1999, 14(2):99-105. PubMed PMID: 10399629. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Disappearance+curves+for+tumor+markers+after+resection+of+intrathoracic+malignancies>

YU, Pengchun, Kerstin WILHELM, Alexandre DUBRAC, et al. FGF-dependent metabolic control of vascular development. *Nature* [online]. 2017, 545(7653), 224-228 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1038/nature22322. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature22322>

Zdravotnická ročenka ČR 2015. ÚZIS, 2016; ISSN 1210-9991

SEZNAM ZKRATEK

ACTH	Adrenokortikotropní hormon
AFP	Alfa-fetoprotein
ALP	Alkalická fosfatáza
APC	Adenomatous polyposis coli
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
CA 125	Antigen karcinomu 125
CA 15-3	Antigen karcinomu 15-3
CA 195	Antigen karcinomu 195
CA 19-9	Antigen karcinomu 19-9
CA 242	Antigen karcinomu 242
CA 50	Antigen karcinomu 50
CA 72-4	Antigen karcinomu 72-4
CEA	Karcinoembryonální antigen
CLIA	Sandwich Chemiluminescent Immunoassay
CYFRA 21.1	Serum cytokeratin fragment 21.1.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E2F	E2F transkripční faktor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
FGF	Fibroblastový růstový faktor
FGF 19	Fibroblastový růstový faktor 19

FGF 21	Fibroblastový růstový faktor 21
FGF 23	Fibroblastový růstový faktor 23
FGF 1	Kyselý fibroblastový růstový faktor
FGF 2	Bazický fibroblastový růstový faktor
hCG	Choriogonadotropin
HK2	Hexokináza 2
ICAM-1	Intercelulární adhezivní molekula 1
ICAM-2	Intercelulární adhezivní molekula 2
IRMA	Imunoradiometrická analýza
KRK	Kolorektální karcinom
MLH1	mutL homolog 1
MSH2	mutS homolog 2
NOR	Národní onkologický registr
pRb	Retinoblastomový protein
RB gen	Retinoblastomový gen
RCF	Relative centrifugal force
RPM	Revolutions per minute
RT	Room temperature
SAS 9.4	Statistical Analysis Software release 9.4
SCC antigen	Squamous cell carcinoma antigen
SP1	Spacer peptide 1
TP53	gen pro protein p53
TPA	Tkáňový polypeptidický antigen

TPS	Tkáňový polypeptidický specifický antigen
VCAM-1	Vaskulární intercelulární adhezivní molekula 1
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Regionální mízní uzliny pro danou anatomickou lokalizaci, resp. její část (str. 14)

Tabulka 2: T - rozsah primárního nádoru (str. 14)

Tabulka 3: N- rozsah postižení regionálních mízních uzlin (str. 15)

Tabulka 4: M- přítomnost metastáz (str. 15)

Tabulka 5: Rozdělení onemocnění do stadií na základě TNM klasifikace (str. 16-17)

Tabulka 6: Rozdělení nádorových biomarkerů podle funkce (str. 25)

Tabulka 7: Reaktivita různých testů/protilátek proti fragmentům cytokeratinu (str. 27)

Tabulka 8: Referenční, hraniční a patologické hodnoty nádorových markerů CEA, CA 19-9, TPA, TPS (str. 43)

Tabulka 9: Patologické stavy měnící referenční hodnoty hladiny nádorových markerů (str. 44)

Tabulka 10: Věková charakteristika skupin pacientů a probandů, kteří vstoupili do studie (str. 45)

Tabulka 11: Hladiny markeru FGF 23 v plazmě probandů kontrolní skupiny (str. 47-51)

Tabulka 12: Hladiny markeru FGF 23 v plazmě pacientů s kolorektálním karcinomem (str. 52-54)

Tabulka 13: Hladiny markeru FGF 23 v plazmě pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu (str. 55-59)

Tabulka 14: Hodnoty FGF 23 u posuzovaných skupin (str. 61)

Tabulka 15: Předoperační hodnoty biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia I, II (str. 62)

Tabulka 16: Korelace předoperačních hodnot biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia I, II (str. 63)

Tabulka 17: Předoperační hodnoty biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia IV s jaterními metastázami (str. 63)

Tabulka 18: Korelace předoperačních hodnot biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia IV s jaterními metastázami (str. 64)

Tabulka 19: Hodnoty biomarkerů pacientů s kolorektálním karcinomem stadia IV a metastázami do jater před operací a po operaci (str. 64)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Princip metody IRMA (str. 33)

Obrázek 2: Princip metody CLIA využívající enzym (str. 34)

Obrázek 3: Princip CLIA s protilátkou přímo značenou luminoforem (str. 35)

Obrázek 4: Analyzátor LIAISON® XL pro stanovení koncentrace analytu metodou CLIA na Oddělení imunochemické diagnostiky, FN Plzeň (str. 38)

Obrázek 5: Souprava pro stanovení analytu FGF 23 metodou CLIA firmy Diasorin (str. 39)

Obrázek 6: Prostor v analyzátoru LIAISON® XL pro stojánek s analyzovanými vzorky (str. 40)

Obrázek 7: Hodnoty koncentrace FGF 23 kalibračních roztoků zobrazené výsledky na monitoru přístroje LIAISON® XL (str. 40)

Obrázek 8: Stojánek pro zkumavky se vzorky na analýzu v přístroji LIAISON® XL (str. 41)

Obrázek 9: Hodnoty koncentrace FGF 23, zobrazené výsledky na monitoru přístroje LIAISON® XL (str. 42)

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Rozložení hodnot koncentrací FGF 23 mezi kontrolní skupinou, pacienty s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu a pacienty s kolorektálním karcinomem (str. 61)

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Příloha I:

Vážená paní

Martina Peštová

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchrannářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních vyšetření, používaných na *Oddělení imunochemické diagnostiky (OID) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Fibroblast growth factor 23 (FGF23) a jeho význam pro onkologickou praxi*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka *OID* souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- ***Sběr informací budete provádět pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc., primář OID FN Plzeň.***

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete Zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová

manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP

zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň

tel. 377 103 204, 377 402 207

e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

1. 3. 2018