

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

**Využití stanovení Trefoils factors 1, 2 a 3
u gravidních žen. Pilotní studie.**

Ing. Gabriela Bilíková

Diplomová práce

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
SCIENCES

**Use of measurement of Trefoil factors 1, 2 and 3 of
pregnant women. A pilot study.**

Ing. Gabriela Bilíková

Thesis

2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ing. Gabriela Bilíková**
Osobní číslo: **C10947**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Využití stanovení Trefoils factors 1, 2 a 3 u gravidních žen.
Pilotní studie.**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
 - a) Současné informace o TFF, jejich rozdělení a vlastnosti
 - b) Využití TFF z hlediska humánní fyziologie a patofyziologie
 - c) Popřípadě klinická diagnostika TFF
- 2) Praktická část:
 - a) Testování ELISA soupravy na stanovení produktů genu pro TFF 1, TFF2 a TFF3
 - b) Validace a verifikace ELISA stanovení
 - c) Ověření klinického efektu tohoto stanovení u gravidních žen

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA
Přednosta Centra laboratorní medicíny o STŘEDO-
MORAVSKÁ NEMOCNIČNÍ

Datum zadání diplomové práce: **3. října 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2012**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na mou práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4.5.2012

Ing. Gabriela Bilíková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu prof. MUDr. Davidu Stejskalovi, Ph.D., MBA, Eurchem za velmi zajímavé téma diplomové práce, odborné vedení a cenné rady při jejím zpracování.

Velké poděkování patří také mým rodičům a bráškově za jejich podporu, pomoc a rovněž za to, že to celé byli ochotni se mnou znovu absolvovat.

2. SOUHRN

Úvod: Tzv. trefoils (neboli trojlístkové) proteiny jsou rodina minimálně tří příbuzných nízkomolekulárních peptidů, které ve své struktuře obsahují jednu nebo dvě trojlístkové domény. Právě díky téhle typické struktuře byly takto pojmenovány. TFF1 obsahuje pouze jednu doménu a je nejhojněji tvořen buňkami na povrchu žaludeční sliznice. Sliznice žaludku rovněž produkuje TFF2, jedná se o homodimer obsahující dvě trojlístkové domény. Poslední protein, o kterém budu psát, nese označení TFF3, který je tvořen jednou trojlístkovou doménu a nejhojněji se nachází v gastrointestinálním traktu.

Metodika: Byla provedena verifikace zcela nové komerční ELISA soupravy (Biovendor laboratorní medicína a.s.). Pro kvantitativní stanovení těchto proteinů je totiž t.č. nejvhodnější ELISA metoda v sendvičovém uspořádání. Analytické charakteristiky testu byly uspokojivé. Následně byly vyšetřeny gravidní ženy, u kterých byly stanoveny TFF1, TFF2, TFF3, HLA-G, kortikotropin (ELISA, Biovendor laboratorní medicína a.s., Brno, ČR). U všech žen byly doplněny anamnestické a klinické údaje, které byly následně statisticky zpracovány.

Výsledky: U metody ELISA byla provedena kalibrace a zjištěny limity detekce pro jednotlivé TFF. Pro TFF1 byla limitní koncentrace 0,02 µg/l, pro TFF2 0,04 µg/l a pro TFF3 0,01 µg/l. Rovněž byla stanovena přesnost a správnost měření, kdy při stanovení v sérii a mezi sériemi nepřekročil ukazatel hodnoty protilehlé přesnosti 10 %. Při statistickém zpracování vzorků bylo zjištěno, že k významným vzestupům koncentrací TFF2 ($p > 0,01$) a TFF3 ($p > 0,01$) došlo ve III. trimestru. Bylo prokázáno, že TFF1 koreluje s TFF2 a TFF3 koreluje s transkortinem. U HLA-G, AFP, hCG, PAPPa, hCG-beta nebyla souvislost prokázána.

Závěr: Byla provedena verifikace nové ELISA soupravy na stanovení TFF1, TFF2, TFF3 a vůbec poprvé byly tyto parametry vyšetřeny u žen během gravidity. Zdá se, že TFF2 a TFF3 hrají významnou roli během těhotenství a mohli by souviset s maturací plodu. Vztah mezi výskytem vrozených vývojových vad a koncentracemi uvedených parametrů nebyl prokázán.

Klíčková slova: Trefoil Factor, Trojlístkový faktor, TFF, Trojlístková doména, ELISA

3. SUMMARY

Introduction: Trefoil proteins are a family of at least three related low molecular weight peptides. Their structure is comprised of one or two trefoil domains after which the whole family was named. TFF1 contains only one domain and is most frequently produced by the cells of gastric mucosa. TFF2, also produced by gastric mucosa, is a homodimer composed of two trefoil domains. The last protein mentioned in this work, designated TFF3, is formed by one trefoil domain and is mostly found in the gastrointestinal tract.

Experimental part: A verification of a new commercial ELISA kit (Biovendor laboratorní medicína a.s.) was performed. Sandwich ELISA is currently the most valuable method for trefoil protein quantification. The analytical characteristics of the test were found to be satisfactory. Subsequently, TFF1, TFF2, TFF3, HLA-G, transcortin (ELISA, Biovendor laboratorní medicína a.s., Brno, ČR) were quantified in samples from pregnant women. All samples were supplemented with medical history and clinical data of the women, which were then statistically analyzed.

Results: The ELISA test was calibrated and detection limits for individual TFF proteins were determined. Limiting concentrations were found to be 0,02 µg/l for TFF1, 0,04 µg/l for TFF2, and 0,01 µg/l for TFF3. Additionally, precision and accuracy of the measurements were determined, intraassay or interassay coefficient of variation (CV) were always less than 10 %. Statistical analysis revealed a significant increase in concentrations of TFF2 ($p > 0,01$) and TFF3 ($p > 0,01$) during the third trimester. It has been shown to correlate with TFF1 and TFF2, TFF3 correlates with transcortin. The HLA-G, AFP, hCG, PAPP, hCG-beta was not proven relationship.

Conclusion: A new ELISA kit for quantification of TFF1, TFF2, TFF3 was validated, and these parameters were for the first time tested in pregnant women. It seems that TFF2 and TFF3 plays a significant role in pregnancy and could be associated with the fetal maturation. The relation between congenital defects and concentrations of the studied parameters was not observed.

Key words: Trefoil factor, TFF, Trefoil domain, ELISA

4. OBSAH

2. SOUHRN.....	7
3. SUMMARY.....	8
4. OBSAH.....	8
5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	11
6. ÚVOD.....	14
7. TEORETICKÁ ČÁST	15
7.1. TFF rodina	15
7.2. Historie.....	15
7.3. Struktura.....	16
7.4. Jednotlivé TFF	17
7.4.1. Trefoil factor 1.....	17
7.4.1.1. Uplatnění TFF1 při onemocnění.....	20
7.4.2. Trefoil factor 2.....	22
7.4.2.1. Výskyt TFF2 při onemocnění	24
7.4.3. Trefoil factor 3.....	26
7.4.3.1. Souvislost TFF3 s nemocemi u lidí	28
7.5. Souvislost TFF s těhotenstvím.....	29
7.6. Regulace TFF.....	29
7.6.1. Růstové faktory	30
7.6.2. Prozánětlivé cytokiny	30
7.6.2.1. Interleukiny.....	30
7.6.2.2. TNF- α	31
7.6.3. Protizánětlivé cytokiny.....	31
7.6.4. Další regulátory	32
7.7. Využití léčebných účinků TFF	33
7.8. Stanovení TFF.....	34
7.8.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	34
7.8.2. ELISA.....	35
8. CÍL PRÁCE	36
9. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
9.1. Přístroje a pomůcky	37

9.2. Statistický program	37
9.3. Reagencie	37
9.4. Roztoky a pufry	38
9.5. ELISA pro TFF1	38
9.6. ELISA pro TFF2	39
9.7. ELISA pro TFF3	40
9.8. Standardy	40
9.9. Přesnost a správnost	41
9.10. Odběry vzorků a výběr probantů	41
9.11. Měření vzorků	41
10. VÝSLEDKY	43
10.1. Měření TFF	43
10.1.1. Kalibrace pro TFF1	43
10.1.2. Kalibrace pro TFF2	43
10.1.3. Kalibrace pro TFF3	44
10.1.4. Ověření spolehlivosti testu pro TFF1	44
10.1.5. Ověření spolehlivosti testu pro TFF2	45
10.1.6. Ověření spolehlivosti testu pro TFF3	47
10.2. Testování těhotných osob	48
10.3. Vzorky a statistika	51
10.3.1. První trimestr	51
10.3.1.1. Data I.	51
10.8.1.1.1. Exploratorní analýza dat	52
10.8.1.1.2. Analýza hlavních komponent	53
10.8.1.1.3. Faktorová analýza	57
10.8.1.1.4. Analýza shluků	60
10.8.1.1.5. Shrnutí statistiky	61
10.3.1.2. Data II.	62
10.3.1.2.1. Exploratorní analýza dat	63
10.3.1.2.2. Analýza hlavních komponent	64
10.3.1.2.3. Faktorová analýza	68
10.3.1.2.4. Analýza shluků	70
10.3.1.2.5. Shrnutí statistiky	71
10.3.2. Druhý trimestr	72

10.3.2.1.	Data I.....	72
10.3.2.1.1.	Exploratorní analýza dat	73
10.3.2.1.2.	Analýza hlavních komponent.....	74
10.3.2.1.3.	Faktorová analýza	78
10.3.2.1.4.	Analýza shluků.....	81
10.3.2.1.5.	Shrnutí statistiky.....	82
10.3.2.2.	Data II.....	83
10.3.2.2.1.	Exploratorní analýza dat	84
10.3.2.2.2.	Analýza hlavních komponent.....	85
10.3.2.2.3.	Faktorová analýza	89
10.3.2.2.4.	Analýza shluků.....	91
10.3.2.2.5.	Shrnutí statistiky.....	92
10.3.3.	Třetí trimestr.....	93
10.3.3.1.	Data	93
10.3.3.1.1.	Exploratorní analýza dat	94
10.3.3.1.2.	Analýza hlavních komponent.....	95
10.3.3.1.3.	Faktorová analýza	99
10.3.3.1.4.	Analýza shluků.....	101
10.3.3.1.5.	Shrnutí statistiky.....	102
10.4.	Vztah TFF a vrozených vývojových vad plodu	103
11.	DISKUSE.....	104
12.	ZÁVĚR	105
13.	SEZNAM LITERATURY	106

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFP	Alfafetoprotein
AG013	Geneticky upravený <i>Lactococcus lactis</i>
AGS	Adenokarcinom
AGX0085	Označení kmene <i>Lactococcus lactis</i>
AMK	Aminokyselina
BAK	Benzylalkonium chlorid
BSA	Hovězí sérový albumin
bFGF	Růstový faktor fibroblastů
CaOx	Šťavelan vápenatý
CD	Diferenční antigen
C/EBT	Transkripční faktor
CNS	Centrální nervový systém
CXCR4	Chemokínový receptor
DNA	Deoxiribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxinukleotid trifosfát
E3	Estriol
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
EGF	Epidermální růstový faktor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ES	Karcinom endometria
EtOH	Ethanol
FBC	Plný krevní obraz
FCS	Fetální telecí sérum
GATA	Rodina genů
GAPDH	Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GIT	Gastrointestinální trakt

GKN	Gastrokin
GvH	Reakce štěpu proti hostiteli
GvL	Reakce štěpu proti leukémii
HCC	Hepatoceulární karcinom
HCG	Lidský choriový gonádotropin
HCT111	Buňky rakoviny tlustého střeva
HCT116	Buněčná linie v rakovině tlustého střeva
HCT8/S11	Buněčná linie v kolorektálním karcinomu
HDL	Vysokodenzitní cholesterol
HIF-1	Hypoxie vyvolaná faktorem 1
HGH	Růstový hormon
HLA-G	Hlavní lidský antogen-G
HNF	Rodina okřídlených faktorů
HRP	Křenová peroxidáza
HSP	Lidský spasmolytický polypeptid
HT-29	Buněčná linie v tlustém střevě
ICC	Intrahepatální cholangiokarcinom
IEC18	Diploidní střevní buňky krysy
IGF-1	Růstový faktor-1
IL	Interleukin
pI	Izoelektrický bod
ITF	Intestinální trefoil factor (Střevní trojlístkový faktor)
LDL	Nízkodenzitní cholesterol
MCF-7	Buněčná linie v prsu
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MUC	Mucin
NF-κB	Nukleární faktor aktivovaných B-lymfocitů

NMR	Nukleární magnetická rezonance
OM	Ústní mukóza
PAPP	Těhotenský plasmatický protein
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PD	Farmakodynamika
PK	Farmakokinetika
PPAR	Proliferátory peroxizómů aktivovaný receptor
PS2	Jiné označení pro TFF
PSP	Prasečí spasmolytický polypeptid
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SML1	Spasmolysin
SP	Spasmolytický polypeptid
STAT	Rodina transkripčních faktorů
SOR	Žaludeční specifický nádorový receptor
<i>T. spiralis</i>	<i>Trichnella spiralis</i>
T84	Buňky tlustého střeva
TFF	Trefoil factor (trojlístkový faktor)
TGF	Transformující růstový faktor
T _{H2}	Pomocné T-lymfocyty
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor necrosis factor
UACL	Buněčná linie
UE3	Nekonjugovaný estriol

6. ÚVOD

Klinická biochemie a laboratorní medicína jsou velmi důležité vědní obory, které zkoumají pochody v lidském organismu. Předmětem studie těchto vědních disciplín je struktura a funkce základních biochemických složek, jako jsou např. sacharidy, lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a mnoho dalších. Tyto vědy jsou úzce spjatá s medicínou a jsou tedy velmi důležité pro léčbu, ale i prevenci různých onemocnění.

Analýzou biologického materiálu zjišťuje množství důležitých elementů vznikajících chemickou přeměnou v lidském těle. Může se jednat o hromadění, nebo naopak strátu v koncentraci některých metabolitů. Změny koncentrací těchto složek přispívají ke stanovení diagnózy onemocnění, jeho prognóze, ale i účinnosti zvolené terapie.

TFF proteiny, jež ve svojí práci studuji, jsou malé kompaktní bílkovny. Pro svou charakteristickou trojlístkovou strukturu dostaly své označení. Jedná se o rodinu tří příbuzných genů označovaných TFF1, TFF2 a TFF3. Tyto proteiny jsou produkovány epitelovými buňkami v lidském těle. Pokud dojde k poškození sliznice, která je tvoří, dochází k jejich masivní tvorbě, což přizpívá k jejímu hojení a obnově daného epitelu.

Jejich výskyt je ovšem spojený s různými zánětlivými stavy v těle a objevují se i při některých typech rakoviny. Pro své vlastnosti mohou být použity jako vhodný marker daného onemocnění, ale i prognostický ukazatel.

Při těhotenství dochází rovněž k produkci těchto proteinů. Předložená práce zkoumá, vůbec poprvé, koncentrace všech tří TFF v průběhu jednotlivých trimestrů.

7. TEORETICKÁ ČÁST

7.1. TFF rodina

Trefoil (trojlístkové) proteiny se objevují u různých druhů živočichů. U obojživelníků jsou vylučovány kožními žlázami, u hlodavců a prasete se vyskytují v GITu. U člověka mají výskyt v mnoha tkáních (Al-azzeah, 2001).

Jedná se o malé kompaktní bílkoviny, které se vylučují epiteliálním povrchem sliznic. TFF rodina je tvořena třemi různými peptidy, které označujeme TFF1, TFF2 a TFF3. Tvorba těchto proteinů je kódována v DNA (Samsona, 2008). U myši se nachází na chromozómu 17 (Okada, 2005), u lidí v blízké vzdálenosti na krátkém raménku chromozomu 21q (Baus-Loncar, 2005; Blin, 2005). Fluorescenční *in situ* hybridizací s genomickou sondou o velikosti 2,1 kb bylo zmapováno přesné místo výskytu a to q22.3. Mapování lidské genomové DNA pomocí pulzní gelové elektroforézy ukázalo, že všechny 3 geny jsou spolu pevně spjaté (Chinery, 1996).

Během evolučního vývoje jsou proteiny velmi stálé (Haruhiko, 2005) a to jak u člověka, tak u ostatních živočišných druhů (Marchbank, 2001).

7.2. Historie

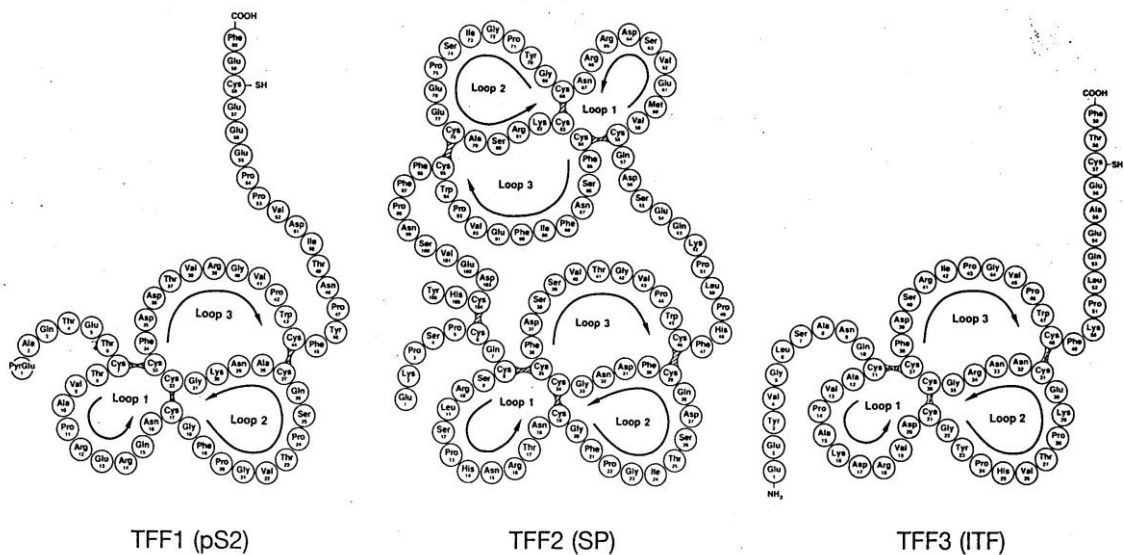
První zmínka o těchto genech byla zaznamenána v roce 1980, kdy Jorgensem se svým kolektivem popsal spasmolytický peptid pankreatu (PSP). Později Westley a Rocheford zveřejnili jeho velikost 46 kDa. Masrakowski et al. izolovali a charakterizovali příslušný úsek DNA a označili ho jako PS2. Ke sjednocení jmen došlo až v roce 1996 a rodina dostala označení TFF na základě struktury trojlístkové domény (Blin, 2005).

Sekvence aminokyselin TFF byla poprvé zaznamenána v roce 1981. Jednalo se o sekvenci TFF2 ze sliznice prasat (Thima, 2005). 1982 byl identifikován TFF1 jako estrogen citlivý gen v karcinomu prsu buněčné linie MCF-7 (Al-azzeah, 2001). První lidská nukleotidová sekvence kódující TFF1 byla popsána v letech 1984-1985 (Thima, 2005). TFF2 byl objeven v roce 1990 jako lidský homogen peptidu izolovaného z prasečí slinivky břišní (Al-azzeah, 2001). Jako poslední bylo popsáno pořadí

aminokyselin TFF3, a to v roce 1991 u potkana (Thima, 2005). To přispělo k objevu lidského TFF3 v roce 1993 (Al-azzeah, 2001).

7.3. Struktura

Jako první byla prozkoumána sekundární struktura TFF a to za pomoci NMR v roce 1992. O rok později byla nalezena terciární struktura (Thima, 2005).



Obr. č. 1: Pořadí a vzdálenosti genů jednotlivých TFF (Al-azzeah, 2001).

Analýza struktury exonů TFF peptidů odhalila velmi podobnou organizaci. První exon kóduje sekreci signálu sekvence. Druhý a třetí exon kódují trojlístkovou doménu a poslední kóduje tři až čtyři karboxylové zbytky. Gen pro TFF1 je tvořen třemi exony. TFF2 je tvořeno 2 a 3 exony kódující dvě domény, které jsou mezi sebou odděleny introny. TFF3 díky svým třem exonům vykazuje vysokou homologii s TFF1 (Al-azzeah, 2001).

Všechny peptidy, patřící do TFF rodiny, mají tedy charakteristickou strukturu tvořenou třemi smyčkami (<http://www.zdravarodina.cz/med/med1202/med120218.html>), které jsou naskládány vedle sebe (Thima, 2005). TFF1 a TFF3 mají pouze jednu tuto doménu. TFF2 obsahuje tyto domény dvě (Samsona, 2008), jedná se tedy o homodimer (Devine, 2000).

Doména bývá označována i jako P-doména (Graness, 2002), je tvořena přes tři intramolekulární disulfidické můstky a charakterizuje ji tzv. „trojlístková“ struktura (Kinoshita, 2000; Samsona, 2008). Samotná doména obsahuje sekvenci 38 nebo 39 aminokyselin, ve kterých se nachází 6 zbytků cysteinu. Pravidelnost struktury je zachována rozestupem již zmíněných disulfidických můstků a to v 1-5, 2-4 a 3-6 konformaci (Thima, 2005).

TFF1 a TFF3, které mají pouze jednu doménu, mohou tvořit dimery prostřednictvím sedmého cysteinového zbytku, který se nachází u C-konce peptidu (Haruhiko, 2005; Madsen, 2007). Spojením dvou zbytkových cysteinů, které jsou k dispozici od každého monomeru, vzniká další disulfidická vazba, která slouží k dimerizaci. Monomer a homodimer TFF1 jsou symetričtější než stejné formy TFF3 (Emamia, 2004). Vlastnosti TFF1-TFF3 heterodimerů je těžké předvídat (Devine, 2000). Různé formy glykosylace u vytvořených dimerů mají za důsledek jejich funkční rozmanitost (Emamia, 2001). Velikost monomerní formy TFF3 je 6694 Da a dimerní 13146,8 Da (Al-azzeah, 2001). Předpokládá se, že dimerní forma je reaktivnější než monomerní (Emamia, 2004).

Celková kompaktnost molekul TFF má velký význam pro stabilitu (Haruhiko, 2005; Madsen, 2007) při proteolytických degradacích zejména v žaludku, ale i v dalších částech zažívacího traktu (Madsen, 2007). K tomu přispívá velká odolnost ke kyselinám a enzymům, ale i vyšším teplotám (Wong, 1999; Fernández-Estívariz, 2003). Jakákoli změna trojlístkové struktury, ale i její oslabení, má za následek ztrátu odolnosti k proteázám (Kinoshita, 2000).

7.4 Jednotlivé TFF

7.4.1 Trefoil factor 1

TFF1, původně označován jako estrogen indukující rakovinu prsu (BCEI) (Al-azzen, 2001), nověji jako peptid spojený s rakovinou prsu (PS2) (Rodrigues, Attoub, 20003; Madsen, 2007; Rivat, 2005). V databázi proteinů je označován jako P04155.

Jedná se o malý sekvenční protein s molekulovou hmotností 9,150 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/P04155>) Nezralá forma obsahuje 84 AMK a postupuje

do peptidu tvořeného 60 aminokyselinami (Al-azzeah, 2001; Emami, 2001; Samsona, 2008).

```
      10      20      30      40      50      60
MATMENKVIC ALVLVSMMLAL GTLAEAQ TET CTVAPRERQN CGFPGVTPSQ CANKGCCFDD

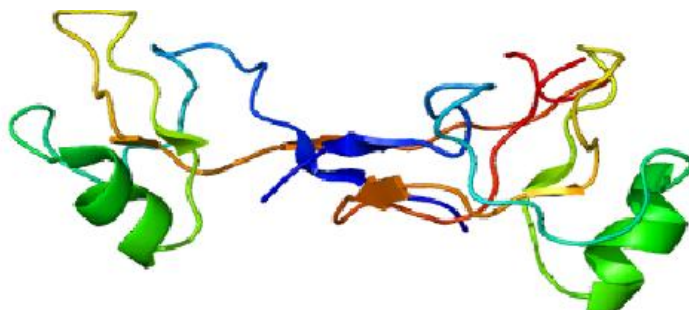
      70      80
TVRGVPWCFY PNTIDVPPEE ECEF
```

Obr. č. 2: Sekvence aminokyselin TFF1

<http://www.uniprot.org/uniprot/P04155>

Izoelektrický bod TFF1 je 4,29 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P04155>). Protože je silně vyvoláván tvorbou estrogenu, je jeho koncentrace u žen vyšší než u mužů (Kato, 2004). Estrogen působí na regulaci genové exprese prostřednictvím TFF1 a obě tyto složky aktivují protein 1 (AP1) (Perry, 2007).

TFF1 je tvořen pouze jednou „trojlístkovou“ doménou, ale má zbytkový cystein v poloze 58, který je nezbytný pro tvorbu dimerů (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-1-human-elisa>; Newron, 2000). Schopnost tvořit dimery, přes zbytkový cystein, je velmi důležitá (Al-azzeah, 2001). TFF1 existuje jako dva monomery a dva dimery. Jedná se o homodimer a heterodimery převážně s gastrokinem 2 (GKN2) (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-1-human-elisa>; Moss, 2008). GKN2 byl imunopurifikace pomocí TFF1 specifických protilátek získaných z lidských buněk žaludeční sliznice (Moss, 2008). Bylo prokázáno, že dimery TFF1 silněji stimulují buněčnou migraci než jeho monomery (Prest, 2002).



Obr. č. 3: Schéma molekuly TFF1

http://en.wikipedia.org/wiki/Trefoil_factor_1

Bylo zjištěno, že TFF1 se nachází v normální lidské žaludeční sliznici ve třech molekulových formách. Většina je tvořena jako komplex o velikosti 25 kDa. Další formou je rekombinovaný monomer TFF1 o velikosti 6,5 kDa a pouze malé množství TFF1 je dimerizováno (Newron, 2000).

TFF1 se podílí na diferenciaci GIT buněk v G1-S fázi buněčného cyklu, před a po snížení apoptózy (Bossenmeyer-Pourie, 2002). Proto se největší význam TFF1 nachází právě v GITu (žaludek, tenké střevo, slinivka), kde je lokalizován s mucinem (MUC5AC) a je spjatý s hojením a stabilitou této slizniční vrstvy. Převážně ho tedy tvoří buňky na povrchu sliznice zažívacího traktu (Ruchand-Sparagano, 2004; Sasaki, 2007).

TFF1 vyvolává dva typy buněčné odpovědi. Snižuje proliferaci buněk tím, že snižuje G1-S fázový přechod (Bossenmeyer-Pourie, 2002). Bylo prokázáno, že zpoždění buněčného cyklu vede k progresi v buňkách žaludečního karcinomu (Perry, 2007). Z toho vyplývá, že TFF1 zprostředkovává zvýšení hladiny inhibitorů cyklin-dependentních kináz. Rovněž chrání buňky před apoptózou. V tomto procesu se TFF1 signalizace zaměřuje na aktivaci kaspázy-9. Obě tyto vlastnosti ukazují na antiproliferační a antiapoptické funkce TFF1 (Bossenmeyer-Pourie, 2002).

Bylo zjištěno, že existují autokrinní a parakrinní způsoby umožňující produkci TFF1. Tato produkce způsobí v sousedních buňkách genetickou změnu a vyvolá počáteční transformaci a rozšíření procesu proti restriktivnímu mikroprostředí (Rideloffa, 2011).

Tenhle peptid se vyskytuje i ve slinných žlázách, dýchacích cestách a očích (Bauche, 2011). Lze ho nalézt v epiteliálních buňkách a submukózních žlázách nosní sliznice, v řasinkových buňkách průdušnice a průdušinek (Madsen, 2007). V dýchacích cestách je hlavní luminární složka a to zejména v subslizniční žláze spolu s MUC5B (Oertel, 2001). Téměř souměrně se TFF1 vyskytuje ve všech oblastech mozku. Vysoká hladina se nachází v hypotalamu, frontální kůře a mozečku. V hypotalamu se tvoří na astocytech. Exprese se výrazně snižuje během postnatálního vývoje, což vede k hypotéze, že TFF1 může hrát důležitou roli při vývoji mozku (Hinz, 2004).

Lze ho pozorovat i na očním pozadí, kde se nachází v epiteliálních buňkách horní části, ve kterých dochází k buněčné diferenciaci (Bossenmeyer-Pourie, 2002). TFF1 slouží i k ochraně spojivek. Za pomoci imunofluorescence bylo zjištěno (Langer, 1999), že pohárkové buňky spojivkového epitelu syntetizují a vylučují TFF1 a zároveň TFF3 (Paulsen, 2002). Tento malý protéza-rezistentní peptid spolu s mucinem odpovídá za

vlastnosti slzného filmu, jako jsou hojení ran rohovky a k léčbě jejich motogenických vlastností (Langer, 1999; Buron, 2008). Slzný film je 35-40 μm silný a skládá se ze 3 vrstev. Vnější vrstva je tvořena lipidy, střední obsahuje vodnou fázi a vnitřní vrstvy, velikosti přibližně 30 μm a obsahující mucin MUC5AC a TFF peptidy (Langer, 1999). TFF1 chrání spojivku před benzylalkonium chloridem (BAK) a UV zářením, jenž vedou k apoptóze. Slzný film dále obsahuje vodu, antimikrobiální látky, cytokiny, lipidy a již zmíněný mucin a TFF (Buron, 2005).

Western blott analýzou za pomoci monoklonálních protilátek proti TFF1 byl prokázán jeho výskyt v moči. Jeho role v ledvinách a v moči nebyla přesně definována. Prokázalo se, že má schopnost inhibovat růst krystalů šťavelanu vápenatého (CaOx). TFF1 může vázat Ca^{2+} ionty, přičemž vznikají dimery TFF1-Ca v moči. Vychytávání vápenatých iontů přispívá k inhibici tvorby šťavelových krystalů. Koncentrace 7 ng/ml TFF1 inhibuje růst krystalů CaOx již po 10 minutách (Chutipongtanate, 2005).

Selektivní afinita TFF1 s mědí vytvoří vazbu, která indukuje konformační změny v terciální struktuře. Měď by mohla ovlivnit biologickou aktivitu TFF1. Objevuje se i hypotéza, že se TFF1 podílí na regulaci a dopravě mědi v těle (Tosco, 2007).

7.4.1.1. Uplatnění TFF1 při onemocnění

Nahromadění TFF1 je znatelné především při zánětlivých stavech (Buron, 2005). Při vředech způsobených bakterií *Helicobacter pylori* byla prokázána snížená hladina TFF1 (Kato, 2004). Často je také jeho výskyt spojován s Background chronickou ulcerální konduktivitou v GITu a s vředy tvořenými buněčnou linií UACL (Pera 2001), kde se nachází epidermální růstový faktor (EGF). Hypotéza, že TFF1 ovlivňuje EGF byla podpořena studií oEGF na myších, které měly nižší úroveň TFF1 (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-1-human-elisa>).

U ulcerózních a akutně zánětlivých střevních onemocnění jako jsou Crohnova choroba, duodenální vřed nebo hemoragická rektokolitida je TFF1 ektopicky vyjádřený po celé délce GITu (Bossenmeyer-Pourié, 2002; Kouznetzova, 2007).

Zvýšená koncentrace tohoto proteinu byla rovněž prokázána při alergiích, kdy je TFF tvořeno sliznicí průdušnice (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-1-human-elisa>). Zde hraje TFF1 důležitou roli, jelikož ho

lze použít jako marker značící poškození epitelu dýchacích cest. Začíná se totiž tvořit již 24 hodin po expozici a tento nárůst trvá po dobu 7 dnů (Greeley, 2010).

U TFF1 byla prokázána regulace estrogenu v buněčné linii rakoviny prsu MCF-7 a primárním karcinomu prsu. Ačkoli estrogen stimuluje růst buněk karcinomu prsu a TFF1, nepůsobí jako parakrinní mitogen, ale spíše jsou účinky estrogenu zprostředkovány dalšími růstovými faktory (TGF) (Baus-Loncar, 2005). Jedná se o silný chemoatraktant pro buňky rakoviny prsu a je to přímý důkaz o biologické funkci TFF1 v rakovině prsu (Prest, 2002). TFF1 zde přispívá k efektivní mobilitě buněk, které mohou být důležité pro invazi a metastazující vlastnosti agresivního karcinomu prsu (Espino, 2006). Buňky rakoviny prsu produkují značné množství monomerů i dimerů TFF1 (Prest, 2002). Je možné ho tedy využít jako jeden z faktorů při diagnostice a prognóze rakoviny prsu. Z toho důvodu bývá TFF1 označován za tumor supresorový gen (Blin, 2005; Espino, 2006). Nedostatek TFF1 zvyšuje tumoricitu lidských buněk rakoviny prsu a nádorech prsních žláz. Tenhle efekt je pozorovatelný až u 50 % lidských nádorů prsu, ovšem jeho psychopatologicita se špatně studuje. TFF1 stimuluje invazi a migraci ve všech buněčných liniích (Bauche, 2011).

Využití TFF1 může být předlohou metastatického šíření. Nádorové buňky mohou být přitahovány normální tkání, která má nejvyšší koncentrace TFF1 jako je děloha, zažívací trakt a plíce (Prest, 2002).

Nedostatek nebo mutace v genu TFF1 byla často prokázána u žaludečních karcinomů (Bossenmeyer-Pourié, 2002), kde podporuje buněčnou invazi a blokuje apoptózu (Dardaei, 2011). Nádory žaludku postrádají přítomnost TFF1 až v polovině případů. Konečná studie ukázala, že TFF1 způsobuje inhibici růstu adenokarcinomu (AGS) v lidském žaludku (Bossenmeyer-Pourié, 2002). Také bylo prokázáno, že dimerická forma TFF1 mírně snižuje počet buněk v karcinomu žaludku. U monomerní formy tenhle jev pozorovaný nebyl (Perry, 2007).

TFF1 má i schopnost výrazně snižovat počet buněk v GITu. Tuto teorii potvrdil test TFF1 na životaschopnost diploidních střevních buněk IEC18 u krys a u lidí HCT116 (rakovina tlustého střeva) a AGS (rakovina žaludku). Přidáním 0,1-50 μM rekombinantních lidských TFF1 se snížil počet testovaných buněčných linií v kultivačním médiu. Tento jen byl pozorován již při 0,1 μM TFF1. Celkový pokles na konci experimentu byl o 20 % u IEC18, o 25 % u HCT116 a o 30 % u AGS (Bossenmeyer-Pourié, 2002).

U invazivního intrahepatálního cholangiokarcinomu (ICC) dochází k výraznému snížení koncentrace TFF1. Tato snížená exprese může být vysvětlena metylací v molekule TFF1 (Saraki, 2003).

Při tvorbě metastáz se rovněž vyskytuje TFF1. Jedná se o metastázy z primárních nádorů. Proto lze TFF1 využívat jako informační značku pro detekci mikrometastáz (Bauche, 2011).

7.4.2. Trefoil factor 2

Sliznice žaludku produkuje rovněž druhý peptid patřící do téhle rodiny, a to TFF2, který je ovšem tvořený buňkami, které jsou hlouběji uložené (<http://www.zdrava-rodina.cz/med/med1202/med120218.html>).

TFF2 dříve nesl označení spasmolytický polypeptid (SP) (Rodrigues, Attoub, 2003), spasmolysin (SML1), prasečí spasmolytický polypeptid (PSP) a jeho lidská varianta byla označována jako lidský spasmolytický polypeptid (HSP) (Al-azzeah, 2001; Suemori, 1991). V databázi proteinů ho nalezneme pod označením Q03403 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q03403>).

Lidský homogen TFF2 je v 74 % shodný s prasečím a jeho DNA sekvence je podobná se sekvencí u myši a potkanů (Chi, 2004).

Opět se jedná o malý protein tvořený v nezralé formě 129 AMK a vyzrálá forma má 106 AMK (Al-azzeah, 2001).

```
      10           20           30           40           50           60
MGRRDAQLLA ALLVLGLCAL AGSEKPSPCQ CSRLSPHNRT NCGFPGITSD QCFDNGCCFD

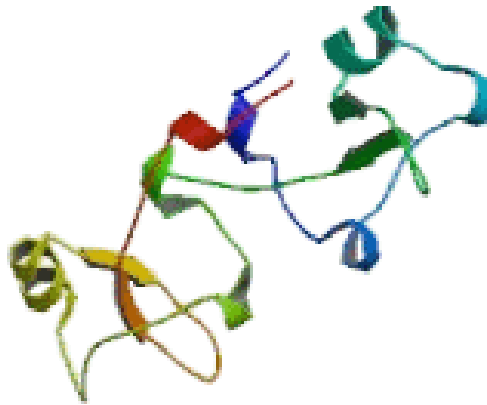
      70           80           90          100          110          120
SSVTGVPWCF HPLPKQESDQ CVMEVSDRRN CGYPGISPEE CASRKCCFSN FIFEVPWCFF

PKSVEDCHY
```

Obr. č. 4: Sekvence aminokyselin TFF2

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q03403>

Izoelektrický bod je 5,51 a molekulovou hmotnost tohoto proteinu je 14,284 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q03403>). Jak již bylo zmíněno TFF2 obsahuje dvě trojlístkové domény a má velmi kompaktní strukturu, která může odpovídat za jeho extrémně vysokou odolnost proti prostředí GITu.



Obr. č. 5: Schéma molekuly TFF2

<http://www.uscnk.com/directory/Trefoil-factor-2-spasmolytic-protein-1%28TFF2%29-0748.htm>

Nejvyšší výskyt TFF2 je ve sliznici žaludku, tlustého střeva a slinivce, kde je lokalizován rovněž s mucinovou vrstvou MUC6 (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-2-human-elisa>). Vyskytuje se ovšem i v buňkách submukózní Brunnerově žláze (Fernández-Estívariz, 2003). TFF působí synergicky s glykoproteiny mucinu a zvyšuje ochranu střevního epitelu před mnoha škodlivými látkami (Cooka, 1999). Z trávicího traktu je vylučován téměř v nemetabolizované formě (Poulsen, 1998). TFF2 má krátký poločas rozpadu, a je volně filtrován ledvinami (Vestergaard, 2002).

Vyšší sekrece TFF2 byla také nalezena v kosterní svalovině, játrech, srdci, slezině, brzlíku, lymfatických uzlinách a kostní dřeni (Blin, 2005). Hojně je tvořen v předním laloku hypofýzy, kde byl zjištěn zvýšený výskyt TFF2 u mužů (Hinz, 2004). Všechny 3 peptidy této rodiny se vyskytují v normální tkáni plic a jsou rovněž součástí dýchacích cest, kde se nacházejí po celé její délce. Nacházejí se zde v rozdílném zastoupení, ze kterého je patrná největší převaha TFF2 (Greeley, 2010).

Přesná funkce TFF2 nebyla dosud plně objasněna. Má však schopnost stimulovat epiteliální buňky, jejich migraci při hojení ran a potlačení apoptózy (Zhang, 2010). Deficience je ovšem spojena s významnou reakcí imunitního systému (Blin, 2005).

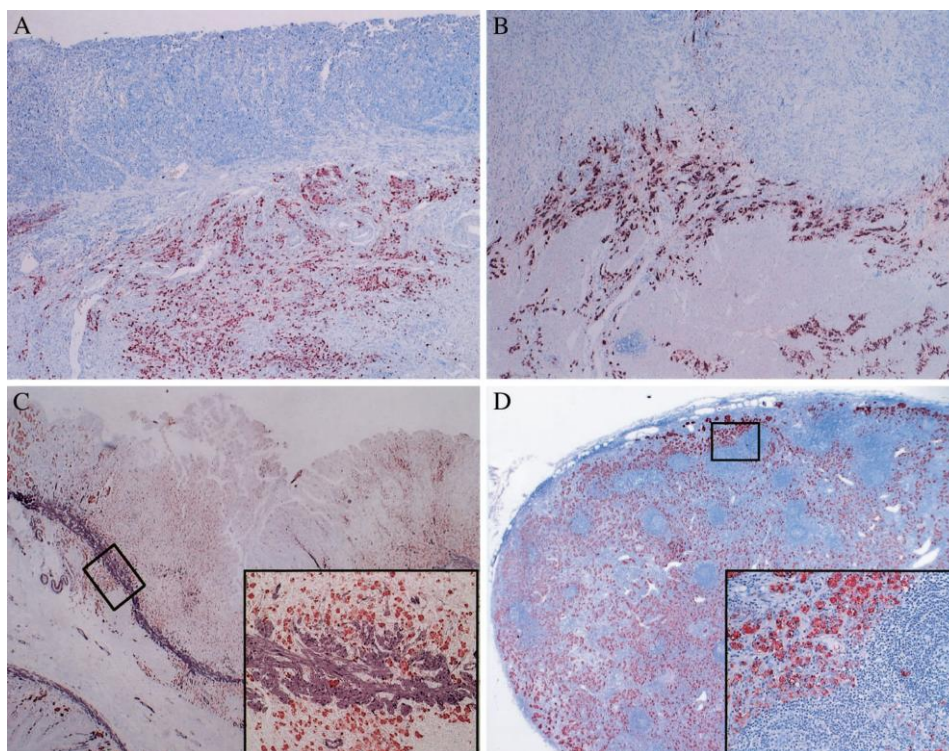
Bylo prokázáno, že TFF2 souvisí s modulací imunitní odpovědi, alergií a astmatem (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-2-human-elisa>). Tato souvislost byla zkoumána na potkanech, kde se TFF2 v lymfatické tkáni účastní imunitní odpovědi. Po experimentální indukci imunitní odpovědi se v lymfatické tkáni potkana zvýšila produkce TFF2 1,5-3 krát (Cook, 1999). TFF2 může být alergenem indukovaný plicní genový produkt, který je různě upravován T_{H2} cytokíny IL-4, IL-13 a STAT6 (Nikolaidis, 2003; Chi, 2004). Tímto se účastní do akutní a chronické fáze experimentálního astmatu pomocí samostatných indukčních drah (Chi, 2004). Ačkoli TFF2 vyvolává expresi daných cytokinů, nejedná se o podmínku pro indukci TFF2 (Nikolaidis, 2003).

7.4.2.1. Výskyt TFF2 při onemocnění

Prokázalo se, že stejně jako TFF1 má i tento peptid souvislost s Crohnovou zánětlivou nemocí střeva, kdy se jeho koncentrace v séru rovněž zvyšuje (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-2-human-elisa>). TFF2 může být také produkován v souvislosti s infekcí *Helicobacter pylori* (Dhar, 2005).

Hladina TFF2 se v séru ve vyšších koncentracích objevuje také u septických pacientů, kdy množství TFF2 přesně koreluje s prognózou septického stavu (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-2-human-elisa>). V okolí poškozené sliznice dochází k rychlé indukci TFF2, a to už do 30 minut. Tím přispívá k rychlé restituci poškozené sliznice a zvýšení buněčné motility (Dhar, 2005).

TFF2 se vyskytuje při rakovině žaludku, v jeho blízkosti a objevuje se i u nádorových metastáz. Zvýšené hodnoty jsou prokázány ve velkých nádorech a v pokročilých stádiích žaludečních rakovin. Je možné ho považovat za prognostický ukazatel tohoto nádorového onemocnění. Buněčná lokalizace TFF2 je charakteristická nejen pro nádorové onemocnění žaludku, ale pro každý histologický typ těchto orgánových nádorů. V difúzním karcinomu žaludku se nachází v cytoplasmě a u střevního typu rakoviny žaludku se vyskytuje v buněčných membránách (Dhar, 2005).



Obr. č. 6: Výskyt TFF2 (červená barva) u rozptýlených nádorů lymfatických uzlin a metastáz A, B, nádorové buňky u malých i velkých nádorů C, regionální metastáze nádoru lymfatických uzlin D (Dhar, 2003)

TFF2 aktivace probíhá přes CXCR4 chemokinové receptory v nádorových buněčných liniích. Zde vyvolá tvorbu mitogenů, které aktivují proteinové kinázy v rakovinných buňkách žaludku a slinivky (Dubeykovskaya, 2009).

Vysoké hodnoty lze nalézt v séru při rakovině prostaty, prsu, tlustého střeva či nádorech vaječníků (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-2-human-elisa>). TFF2 je vyjádřen buňkami MCF-7 při rakovině prsu. Při snížení koncentrace vyvolává tvorbu velmi složitých struktur v rozvětveném karcinomu prsu. Vliv TFF2 na buněčnou motilitu vede k 30 % snížení počtu apoptických tělísek v kultivovaných buňkách MCF-7 (Chi, 2004).

Při idiopatické cystitidě u koček, byl prokázán snížený výskyt TFF2. Zjištěný deficit je velmi významný při diagnostice tohoto onemocnění. Detekce sníženého vylučování TFF2 močí slouží jako biomarker usnadňující diagnózu. Nedostatek TFF2 vede ke zhoršení obnovy tkání a imunitní obrany (Lemberger, 2010).

7.4.3. Trefoil factor 3

TFF3 je pro svůj převážný výskyt ve střevech někdy označován jako intestinální trefoil factor (ITF) (Tomasetto, 2001; Rodrigues, Attoub 2003), který lze nalézt v databázi proteinů pod označením Q07654 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q07654>).

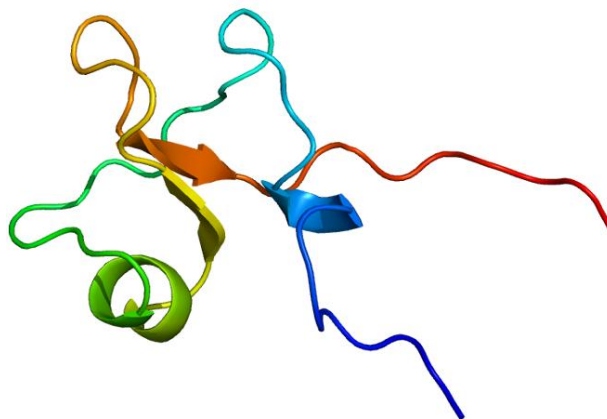
Jedná se o peptid tvořený v nezralé formě 80 AMK a ve formě zralé 59 AMK (Al-azzeah, 2001; Samson, 2008).

```
      10      20      30      40      50      60
MAARALCMLG LVLALLSSSS AEEYVGLSAN QCAVPAKDRV DCGYPHVTPK ECNNRGCCFD
      70      80
SRIPGVPWCF KPLQEAECTF
```

Obr. č. 7: Sekvence aminokyselin TFF3

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q07654>

Molekulová hmotnost TFF3 je 8,641 kDa a izoelektrický bod pI je 5,66 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q07654>).



Obr. č. 8: Schéma molekuly TFF3

http://en.wikipedia.org/wiki/Trefoil_factor_3

Jedná se o nízkomolekulární protein (Xue, 2010), který je produkován hlavně buňkami sliznice tenkého a tlustého střeva (Kalabis, 2006). Tvoří ho pohárkové buňky a

z nich se vylučuje do lumena střevního traktu (Yu, 2004). Buňky, kterými je tvořen rovněž produkují mucin (<http://www.zdravarodina.cz/med/med1202/med120218.html>). MUC2 je sekreční bílkovina tvořící nerozpustnou slizniční bariéru, která chrání střevní lumen (Dardaie, 2011; Sasaki, 2007). TFF3 má cytoprotektivní účinek ve střevech a v GITu podporuje hojení ran, stimuluje migraci epitelových buněk a chrání bariéru střevního epitelu (Tan, 2008). MUC2 společně s TFF3 mají vztah k růstu a diferenciaci HT-29CL.16.E buněk (Blanchard, 2010). Úroveň TFF3 na sliznicích je 0,1 krát nižší než v tenkém střevě. To by mohlo vysvětlit, proč TFF3 nebyl dříve pozorován v žaludku. Je možné, že se vytvoří, když je epitel vystaven tvrdým částem potravy nebo poškozen škodlivými agents a napomáhá tak k fyziologickému zhojení (Karam, 2004). TFF3 tedy chrání střevní epitel před mnoha škodlivými látkami včetně žlučových solí, ale i před toxiny produkovanými bakterií *Clostridium difficile* (Kinoshita, 2000).

TFF3 je také produkován epitelem dělohy a je rovněž obsažen i v děložním sekretu. Ve vyšších koncentracích se nachází při proliferaci a estrogenem řízené fázi menstruačního cyklu (Baus-Loncar, 2005). Nedávno bylo zjištěno, že se hojně vyskytuje v ostrůvcích pankreatu. Zde přispívá ke zvýšení proliferace buněk Langerhansových ostrůvků (Fueger, 2008). Je tvořen v buňkách, které produkují inzulin a glukagon (Jackerott, 2006). Studie byla provedena s lidskými i hlodavčími β -buňkami pankreatu. Jelikož obě formy diabetu zahrnují pokles těchto buněk, může zvýšená exprese prostřednictvím TFF3 hrát velký potenciál pro léčbu tohoto onemocnění (<http://www.biovendor.com/product/immunoassays/trefoil-factor-3-human-elisa>).

TFF3 zvyšuje buněčnou migraci prostřednictvím modulace E cadherin/catenin. Byla zjištěna invaze transformovaných buněk do kolagenové matrice (Haruhiko, 2005; Okada, 2005).

Transkripční regulace TFF3 je řízena přes překladače vazebného místa pro nukleární faktory B a C/EBP. Úsek související s modulací genové exprese je zprostředkovaný vazbou s různými transkripčními faktory DNA (Baus-Loncar, 2004).

Jako ostatní proteiny patřící do téhle rodiny, vyskytuje se i TFF3 v jiných tkáních jako jsou prsní a slinné žlázy (Bignotti, 2008). Rovněž se nachází v jaterní žluči (Sasaki, 2004) a v celém povrchu žlučových cest (Kosriwong, 2011). Má schopnost zvýšit diferenciaci lidského řasinkového epitelu dýchacích cest, a také se účastní obnovy a obrany tohoto epitelu (LeSimple, 2007). V několika studiích byla zjištěna syntéza TFF3 v CNS a to v hypotalamu, hypofýze, terminální kůře a mozečku (Hinz, 2004). TFF3 syntetizované v hypotalamu má anxiolytické a anoxogenní účinky. Je lokalizován

v neuronech vyskytujících se v paraventriculárním a supraoptickém středu hypotalamu. Rovněž se nachází v zadním laloku hypofýzy, odkud se zřejmě dostává do oběhu (Jagle, 2000). Jeho výskyt je prokázán v embryonálním mozku u myši. U potkanů se vyskytuje převážně v hypotalamu, mírný výskyt je však i v hippocampu. U člověka byl zjištěn projev TFF3 v magnocelulárním systému. Je prokázáno, že se syntetizuje v neutronech a posmrtně byl zjištěn ve 3. mozkové komoře. Přesná role nejen TFF3, ale i zbylých dvou proteinů nebyla v CNS dosud plně objasněna (Hinz, 2004).

Jak již bylo řečeno, TFF3 se syntetizuje v slzném kanálku (Paulsen, 2002), ale nevyskytuje se ve zdravém epitelu rohovky. Po epiteliálním poranění rohovky, ovšem dojde ke značné produkci tohoto peptidu. Tento jev přispívá k tomu, že TFF3 hraje klíčovou roli při hojení ran rohovky (Paulsen, 2008).

7.4.3.1. Souvislost TFF3 s nemocemi u lidí

TFF3 se užívá jako genetický otisk špatně diferenciovaných karcinomu endometria (ES) (Bignotti, 2008). Abnormální uvolnění TFF3 bylo zdokumentováno u karcinomu žaludku, prostaty, kůže, papilárním acinózním nádoru ve slinivce a rakovině prsu (Haruhiko, 2005; Bignotti, 2008). Zdá se, že stanovení hladiny TFF3 je důležitý prognostický údaj u některých druhů malignit. Stále není známo, zda se TFF3 přímo podílí na maligním chování nádorových buněk. I přes tento poznatek je TFF3 důležitý diagnostický ukazatel a má velký potenciál jako nový nástroj pro hodnocení předoperačního a pooperačního sledování pacientů s ES. Ke stanovení byla použita in-house specifická ELISA (Bignotti, 2008). Studie u pacientů s pokročilým nádorem žaludku ukázala, že u 49 pacientů ze 111 byl výskyt TFF3 v imunohistochemickém preparátu. Zároveň zde byla nalezena významná korelace TFF3 s věkem (Dhar, 2005). Zvýšená exprese TFF3 byla rovněž nalezena v jaterní tkáni u hepatocelulárního karcinomu (HCC), kde je rozhodujícím genem podílejícím se na tomto druhu rakoviny (Okada, 2005). Zdá se, že TFF3 by mohl být potencionální screeningový marker agresivní rakoviny prostaty (Vestergaard, 2006). Také exprese TFF3 u karcinomu žaludku je pravděpodobně negativním prognostickým znakem. V 56 % nádorů žaludku u mužů byla prokázána významná korelace TFF3 s agresivním fenotypem nádoru (pokročilé stádium tumoru, infiltrované struktury a pozitivní výskyt v lymfatických

uzlinách). Jiná podrobnější studie však ukázala spojení TFF3 se špatnou prognózou nezávisle na stádiu nádoru (Yamachika, 2002).

Snížená exprese TFF3 mRNA je pozorována ve folikulárním karcinomu štítné žlázy. S tím se objevuje vysoké riziko invaze a tvorby metastáz (Takano, 2004).

Dále bylo prokázáno, že zejména monomer TFF3 může zhoršit slizniční vyrážku (Hoffmann, 2005).

Výrazně zvýšená hladina TFF3 je u biliární epiteliální nemoci, což svědčí o jeho významné roli v cytoprotektivě a opravě žlučového epitelu (Kosriwong, 2011).

Patogenní změny v tenkém střevě způsobené hlísticí *Trichnella spiralis*, způsobují tvorbu imunitních a zánětlivých mediátorů. Výzkum byl provedený na *T. spiralis* infikovaných myších, které měli deficit IL-4 nebo TFF3. U myší, kterým chyběl TFF3 došlo k zásadním změnám ve slizniční architektuře jako je např. atrofie klků, hyperplazie krypta (Dehlawi, 2006).

7.5. Souvislost TFF s těhotenstvím

Všechny tři uvedené proteiny TFF rodiny jsou přítomny během fetálního vývoje. Vyskytují se ve fetální tkáni, ale ne v placentě a plodových obalech. Sérové hladiny TFF2 a TFF3 jsou velmi vysoké při těhotenství. Trvalý nárůst v séru matky je pozorován v 10.-39. týdnu těhotenství. Ze studie vyplývá, že příčinou zvýšené koncentrace TFF2 a TFF3, během gravidity je způsobena jeho nadprodukcí placentou. TFF1 se objevuje i v pupečnickové krvi ve stejných koncentracích jakou má matka, zatím co zbylé dva proteiny se zde nacházejí v nižších koncentracích než je tomu u matky (Samson, 2011).

7.6. Regulace TFF

Všechny proteiny, patřící do téhle rodiny, se ovlivňují navzájem (Baus-Loncar, 2005). Koordinovaná činnost mezi jednotlivými peptidy téhle rodiny byla objevena u myší a lidí v žaludku. Jednalo se především o spolupráci mezi TFF1/TFF1 a TFF2/TFF2 (Baus-Loncar, 2004). Doprovodné oblasti těchto genů mají podobnou regulační sekvenci, což naznačuje, že všechny 3 geny jsou regulovány koordinovaně (Perry, 2007).

Jsou však i další látky, které přispívají k jejich regulaci (Baus-Loncar, 2005)

7.6.1. Růstové faktory

Epidermální růstový faktor (EFG) a TFF peptidy mohou působit synergicky při opravě lidských tkání. Jedná se o zvýšenou rychlost opravy v průběhu onemocnění jako je např. astma (Yeh, 2002; Chwieralski, 2004).

TFF2 a TFF3 jsou závislé na receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Účinnost těchto peptidů může být regulováno negativní stimulací EGFR.

Transformující růstový faktor (TGF) ovlivňuje hladinu koncentrace TFF1 v souvislosti s pankreatitidou, kde dochází ke zvýšení tvorby TFF1 (Baus-Loncar, 2005). Kromě toho řídí TFF1 i lidský receptor epidermálního růstového faktoru 2 (HER-2) (Perry, 2007).

Migrační regulační peptidy a aminy stimulují syntézu TFF3. Růstový faktor fibroblastů (bFGF) může rovněž regulovat TFF3 (Baus-Loncar, 2005; Perry, 2007).

Dále jsou TFF peptidy ovlivňovány i jinými faktory, jako jsou např. růstový hormon (hGH), inzulin jako růstový faktor 1 (IGF-1), ale i různé onkogenní podněty (Perry, 2007).

7.6.2. Prozánětlivé cytokiny

TFF peptidy jsou schopné modulovat zánět (Graness, 2002).

7.6.2.1. Interleukiny

Důležitým regulátorem TFF genů jsou zánětlivé cytokiny. Především se jedná o IL-1 β a IL-6, které mohou potlačit činnost a expresi genu TFF1 prostřednictvím NF- κ B a C/BEpb faktorů. Zvýšený zánět, původně neoplastické transformace, může vést ke snížení nádorové supresorové aktivity prostřednictvím inhibice TFF1 (Baus-Lancar, 2004). Inhibiční činnost prozánětlivých cytokinů byla zkoumána při zánětlivých střevních onemocněních a má vliv i na TFF2 a TFF3. IL-6 aktivuje transkripci STAT3 a silně inhibuje transkripci TFF3.

In vitro regulují TFF peptidy nádorové nekrózy, a to především vylučováním IL-6 a IL-8. TFF2 sám nedokáže změnit sekreci daných interleukinů, ale vyvolávají trvalou aktivaci signálů regulujících kinázy. Lze prokázat, že TFF2 zesiluje TNF indukovanou sekreci právě IL-6 a IL-8 (Graness, 2002).

7.6.2.2. TNF- α

In vitro analýza prokázala, že stimulace TNF vyvolává aktivaci NF- κ B, která inhibuje TFF3 (Baus-Loncar, 2004; Zhu, 2005). Ovšem vazebné místo NF- κ B se nachází u všech tří peptidů této rodiny. Stimulace TNF vyvolává až 10-násobnému snížení hladiny TFF3 u nádoru tlustého střeva buněčné linie HT-29 (Loncar, 2003). Adenokarcinom buněčné linie HT-29 byl kultivován v médiu Glutamix a 10 % FCS. Po 24 hodinové inkubaci byly buňky stimulovány TNF v rozmezí koncentrací 2,5-40 ng/ml. Z pokusu vyplynulo, že minimální koncentrace, kdy má TNF výrazný vliv na TFF3 je 20 ng/ml (Baus-Loncar, 2004).

Účinky TNF- α jsou pozorovány v souladu s akutním snížením TFF při zánětech, což vede k opoždění regulace a slizniční obraně (Baus-Loncar, 2005). Regulace TFF3 pomocí TNF- α byla zkoumána kvantitativní RT-PCR společně s genem GAPDH po 24, 48 a 60 hodinách. Prokázalo se, že trvalému snížení TFF3 došlo v souladu s rakovinou tlustého střeva normalizovaném na gen GAPDH. TNF- α třikrát snížil TFF3 už po prvních 24 hodinách, po 48 hodinách došlo k desetinásobné regulaci (Baus-Loncar, 2004).

7.6.3. Protizánětlivé cytokiny

Ve střevech jsou T-lymfocyty vyjádřeny DC4+ T_{H2}, které indikují humorální imunitní odpověď a aktivují tvorbu IL-4 a IL-13 (Dehlaw, 2006). IL-4 a IL-13 silně zvyšují produkci TFF3 při nádorech střev, TFF3 má STAT6 vazebné místo, proto je možná přímá transkripční regulace IL-4 a IL-13 (Baus-Loncar, 2005). IL jsou aktivovány právě přes STAT6 při hnisavých infekcích. IL-4 a IL-13 regulují konkrétní pohárkové buňky, které produkují TFF3 (Blanchard, 2004). IL-4 zprostředkovává zvýšení TFF3 přes *de novo* syntézy proteinů. Přidání aktinomycinu D přes IL-4/IL-13 vede k poklesu hladiny mRNA v TFF3 (Blanchard, 2004).

7.6.4. Další regulátory

Transkripční regulace hraje hlavní roli v projevech TFF genů. Transkripční faktory jako GATA-6 zprostředkovávají expresi TFF1 a TFF2 (Hernández, 2009) a zvyšuje jejich koncentraci 4-6 krát (Chi, 2004). Pohárkové buňky jsou specifickým transkripčním faktorem zapojeným do TFF3 projevů (Hernández, 2009). Jak již bylo zmíněno, jedním z faktorů ovlivňující dané proteiny jsou geny GATA. Jedná se o rodinu šesti příbuzných genů zodpovědných za krvetvorné buňky, střeva a kardiovaskulárního systému (Baus-Loncar, 2004). Souvislost GATA rodiny a TFF může být rovněž potvrzena tím, že se TFF podílí na tvorbě nových cév a to jak za normálních, tak patologických podmínek (Rodrigues, van Aken, 2003). GATA6 je vektor exprese u nádorů žaludku. Výsledkem je aktivace TFF1 a TFF2, TFF3 se neaktivuje (Baus-Loncar, 2004).

Gastrin upravuje koncentraci TFF1 a TFF2. Při regulaci TFF1 gastrinem v žaludku, dochází k postupnému snížení gastrinu a zároveň TFF1, což vede k nádorovému rozvoji.

Prostaglandiny a současně TFF peptidy mají stejnou cytoprotektivní funkci v žaludeční sliznici, to vnuklo myšlenku, že tyto rodiny mohou být spojeny.

Odchytky v žaludeční sliznici jsou obecně indukované s TFF proteiny. To zahrnuje osmotický stres vyvolaný izotonickými tekutinami a EtOH. Hypotonie střeva zvyšuje produkci všech TFF, zatímco hypertonie snižuje TFF1 a TFF3, ale překvapivě zvyšuje TFF2.

Tzv. „okřídlené faktory“ HNF aktivované při akutní fázi vyvolávají produkci TFF1 ve slinivce břišní a v žaludku (Baus-Loncar, 2005). HNF-3 slouží k aktivaci všech genů TFF rodiny (Baus-Loncar, 2004).

Proliferátory peroxizómů aktivovaný receptor γ (PPAR- γ) reguluje TFF2 a buňkách žaludečního epitelu. Jedná se o přímou regulaci (Shimada, 2007).

Hypoxii vyvolávající faktor 1 (HIF-1) (Hernández, 2009) je stěžejní transkripční faktor indukující expresi TFF3 genu v buňkách tlustého střeva (T84). Genová exprese TFF3 stoupá s hypoxií. Tenhle jev lze pozorovat v důsledku již zmíněného hypoxii indukujícího faktoru 1, ale i esterů kyseliny arachidonové a peroxidu vodíku (Perry, 2007). Aktivace rekombinantního TFF3 chrání cévní endotel (Baus-Loncar, 2005).

Nejvýraznější vliv má protizánětlivá kyselina acetylsalicylová, která ale reguluje převážně TFF2 (Baus-Loncar, 2004). Žaludeční poškození vyvolané kyselinou acetylsalicylovou je spojeno s hypoxií a zvýšením koncentrace všech TFF peptidů v žaludeční sliznici. Přítomnost jedné toxické dávky aspirinu, zkoumané na potkanech, zvýšilo produkci TFF1 ve sliznicích. Konkrétně k tomu došlo při konstituci zranění, kde byl zjištěn úbytek buněk na povrchu sliznice (Hernández, 2009). Podáním dávky kyseliny acetylsalicylové však sníží koncentraci všech TFF proteinů v séru (Kawai, 2011). Léčba kyselinou máseľnou se sodíkem a kyselinou 5-aminosalicylovou zvyšuje TFF3 mRNA expresi a snižuje produkci IL-6 (Song, 2006).

7.7. Využití léčebných účinků TFF

Stabilita TFF peptidů je důvodem, že jsou atraktivními kandidáty v léčbě gastrointestinálních onemocnění (Dhar, 2005). Je zde především potenciál jejich využití při léčbě vředů v zařivacím ústrojí (Devine, 2000), ale rovněž u zánětlivých onemocnění střev a postižení střev vyvolené radiochemoterapií (Dhar, 2005). Léčebné účinky TFF3 byly dříve připisovány buněčné proliferaci, ale později bylo zjištěno, že tyto účinky jsou především v podpoře buněčné motility, migrace a případně i inhibici apoptózy (Dhar, 2005).

TFF mají zvláštní roly v rekonvalescenci ústní dutiny a ochraně proti proteolytickým enzymům (Devine, 2000). Některé studie zaměřené na farmakodynamiku (PD) a farmakokinetiku (PK) využívají farmakologicky modifikovaný kmen *Lactococcus lactis* (AGX0085). Jedná se o bakterii označovanou AG013, která je geneticky upravena. Plazmid, který nese gen pro TFF1 je integrován do chromozomu. Tento mikroorganismus je navržen tak, aby vylučoval lidský TFF1 v ústní dutině, kde přispívá k léčbě zánětlivých nemocí sliznice (Chaluwaerts, 2010).

TFF2 zrychluje hojení žaludečních vředů a to jak po ústním, tak podkožním podání. Při podání ústy prošel TFF2 žaludkem, tenkým střevem, ale byl degradován ve slepém střevě. Pouze jeho malá část prošla do tlustého střeva, odkud byla vyloučena stolicí. Většina podaného TFF2 byla vyloučena močí (Poulsen, 1999).

Účinnost léčby TFF3 v klinických studiích ulcerární kolitidy při podávání 10 mg/ml TFF3 v podobě, neprokázala pozitivní výsledky. Může existovat více důvodů, proč tomu tak je. TFF3 může být neúčinný v léčbě u lidí nemocných kolitidou, ačkoliv

zvířecí modely ukázaly stabilní výsledky. Rovněž způsob podání a cesta můžou ovlivnit biologickou činnost TFF peptidů (Mahmood, 2005).

Existuje hypotéza, že TFF3 může být užitečný v profylaxi akutní GvH. TFF3 může představovat novou strategii pro separaci GvH a GvL při transplantacích. Jedná se o účinný doplněk ke klinickému řešení GvH profylaxe (Liang, 2009).

Akutní TFF3 léčba podávaná ústně, výrazně snižuje rozvoj středně těžkých a těžkých poškození ústní mukózy (OM). Zde působí na mukózní bariéru na slizničním epitelu. Jedná se o snadné ambulantní použití TFF3, který se dává ústním sprejem. To slouží k prevenci zánětu ústní sliznice u pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří užívají fluorouracil na bázi chemoterapie (Peterson, 2009).

TFF3 má velký potenciál pro rozvoj ústní peptidové vakcíny. Ústní anti-CETP vakcína i TFF3 mají možnost potlačit aterosklerózu u králíků. Také dochází ke snížení koncentrace LDL a zvýšení HDL (Qi, 2011).

7.8. Stanovení TFF

7.8.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Samotná PCR probíhá v několika teplotních krocích. Nejprve dochází k denaturaci DNA duplexu při 92-96 °C. Na komplementární sekvence jednořetězcové DNA poté nasedají primery. Teplota tohoto děje je obvykle při 45-65 °C. Poslední krok probíhá při 72 °C, při kterém dochází k prodlužování řetězce od ukotvených primerů za pomoci dNTPs a DNA-polymerázy (Bilíková, 2010).

Pro stanovení TFF se používá Real Time – PCR (Baus-Loncar, 2004). Tato metoda je založena na klasickém PCR. Rozdíl je v tom, že speciální přístroj kontinuálně monitoruje přírůstek DNA během každého cyklu. Základní podmínka je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se naváže na syntetickou DNA. Množství fluorescence je poté přímo úměrné nasyntetizované nukleové kyselině (Bilíková, 2010).

Cyklické podmínky pro stanovení TFF genů jsou 95 °C jako denaturační teplota, při 57 °C nasedají primery a prodlužování řetězce probíhá při 72 °C. Primery pro lidský TFF3 a lidský glycerinaldehyd 3-fosfát hydrogenia (GAPDH), které se obvykle používají pro stanovení u rakoviny tlustého střeva současně, jsou:

TFF3-f: 5-CTTGCTGTCCTCCAGCTCT-3

TFF3-r: 5-CCGGTTGTTGCACTCCTT-3
GAPDH-f: 5-TGCACCACCAACTGCTTAG-3
GAPDH-r: 5-GATGCAGGGATGATGTTC-3

(Baus-Loncar, 2004).

Další PCR stanovení lze provést při denaturační teplotě 94 °C po dobu 6min. Následuje připojení primerů o sekvencích:

5-ATGGCTGCCAGAGCGCTCTG-3
5-CAGACAGCCCCACGTAC-3

kteřé probíhá při 60 °C. Pro prodloužení řetězce je volena teplota 70 °C. Celé PCR stanovení probíhá ve 30 cyklech (Chinery, 1996).

7.8.2. ELISA

Metoda ELISA představuje konkrétní a přesnou metodu pro měření koncentrace TFF v séru u zdravých i nemocných (Vestergaard, 2002). Provedení je velmi jednoduché. Vzorek inkubujeme v jamce mikrotitrační destičky předem potažené polyklonálními protilátkami proti lidskému TFF. Následně se destička inkubuje 60 minut při 25 °C. Po uplynutí jedné hodiny se jamky propláchnou a napipetují se do nich polyklonální protilátky anti-TFF s křenovou peroxidázou (HRP) jako konjugátem a opět následuje inkubace 60 min při 25 °C. Následuje další promytí a přidání substrátu. Jako substrát, který bude reagovat s navázanou křenovou peroxidázou, se užívá tetrametylbenzidin (TMB) a inkubuje se při 25 °C tentokrát po dobu 30 minut. Reakci zastavíme přidáním roztoku kyseliny. Koncentraci zjistíme změřením absorbance roztoku při 450 a 630 nm (<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-1-human-elisa>; <http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-2-human-elisa>; <http://www.biovendor.com/product/immunoassays/trefoil-factor-3-human-elisa>)

8. CÍL PRÁCE

Verifikace souprav na stanovení TFF1, TFF2 a TFF3 metodou ELISA. Vyšetření koncentrace TFF1, TFF2, TFF3 v séru u žen během gravidity; tyto údaje nebyly při psaní diplomové práce v odborném písemnictví k dispozici. Porovnání TFF s koncentracem HLA-G, transcortinu a screeningovými ukazateli, které se využívají pro odhad vrozených vývojových vady plodu dle trimestru pacientky (AFP, hCG, PAPP-A, hCG beta, uE3).

9. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

9.1. Přístroje a pomůcky

- ELISA sety, BioVendor, Laboratorní medicína, a. s., Brno, Česká Republika
- Mikrotitrační destička, High Binding, Costar
- Promývačka Columbus, Tecan
- Chlazená centrifuga
- Reader Biotek EL808
- Analytické váhy
- pH metr
- Laboratorní sklo a pomůcky

9.2. Statistický program

- Statistika Verze 7

9.3. Reagencie

- **NaCl**, Lachema, Brno, Česká republika
- **K₂CO₃**, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika
- **NaHCO₃**, Lachema, Brno, Česká republika
- **Tween 20**, Sigma, USA
- **Sacharosa**
- **Albumin z hovězího séra**, Sigma, USA
- **Polyklonární králičí anti-lidské TFF1**, BioVendor, Laboratorní medicína, a. s., Brno, Česká Republika
- **Polyklonární králičí anti-lidské TFF2**, BioVendor, Laboratorní medicína, a. s., Brno, Česká Republika
- **Polyklonární ovčí anti-lidské TFF3**, BioVendor, Laboratorní medicína, a. s., Brno, Česká Republika

- **Biotin značený ovčí polyklonární IgG**, biotinylované v kytu, Pierce Biotechnology, Rockford
- **Biotin značený králičí polyklonární IgG**, biotinylované v kytu, Pierce Biotechnology, Rockford
- **Streptavidin a křenovou peroxidázou**, Amdex
- **Vzorky sér od těhotných žen**
-

9.4. Roztoky a pufr

- **0,1 M uhličitanový pufr**
příprava: 30 ml 0,1M K₂CO₃ se smíchá se 100 ml 0,1M NaHCO₃
- **0,15 M NaCl**
příprava: naváží se 11,753g NaCl a rozpustí ve 100 ml destilované H₂O
- **roztok TBS – Tw**
příprava: 0,05 M Tris-HCl + 0,15 M NaCl + 0,05 % Tween 20
pH upraveno na 7,2
- **roztok TBS – Tw – BSA – myší IgG**
příprava: 0,05 M Tris-HCl + 0,15 M NaCl + 0,05 % Tween 20 + 1 % BSA
+ 1 mg/ml myších IgG
pH upraveno na 7,2

9.5. ELISA pro TFF1

Na dno mikrotitračních jamek byly navázány polyklonární králičí protilátky proti lidské TFF1. Pro navázání byla připravena směs 1 µg/ml protilátek v 0,1 M uhličitanovém pufru. Do jamky bylo napipetováno 100 µl dané směsi a mikrotitrační destička se nechala inkubovat přes noc při 4 °C.

Po inkubaci bylo provedeno promytí roztokem TBS-Tw. Nespecifické vazebné místo bylo blokováno 200 µl roztoku TBS s 4 % sacharózou a 0,5 % BSA. Blokace probíhala 30 minut při 25 °C.

Standardy a vzorky séra 5 krát naředěné roztokem TBS-Tw-BSA-myší IgG byly pipetovány v duplikátu 100 µl/jamku a inkubovány 1 hodinu při 25 °C.

Následně byly jamky mikrotitrační destičky 5 krát promyty roztokem TBS-Tw a do jamek napipetováno 100 μ l biotinu značeného králičími polyklonárními IgG a to v koncentraci protilátek 0,1 μ g/ml. Inkubace byla opět provedena po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.

Po dalších 5 cyklech promytí bylo do jamek napipetováno 100 μ l streptavidinu s křenovou peroxidázou a následovala opět inkubace za stejných podmínek.

Po promytí mikrotitrační destičky bylo do všech jamek dávkováno 100 μ l TMB a reakční směs byla inkubována 10 minut při 25 °C.

Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l 0,2 M kyseliny sírové a výsledné zbarvení roztoku bylo proměřeno při vlnové délce 450 nm.

9.6. ELISA pro TFF2

V mikrotitrační destičce byla navázána směs 1 μ g/ml protilátek rozpuštěných v 0,1 M uhličitanovém pufru. Jako protilátky byly zvoleny polyklonární králičí protilátky proti lidské TFF2. Do jamek destičky bylo napipetováno 100 μ l dané směsi a mikrotitrační destička se nechala inkubovat přes noc při 4 °C.

Po inkubaci následovalo promytí roztokem TBS-Tw a blokace nespecifického vazebného místa přidáním 200 μ l roztoku TBS s 4 % sacharózou a 0,5 % BSA. Blokace probíhala 30 minut při 25 °C.

Vzorky séra byly pro měření 5 krát naředěné roztokem TBS-Tw-BSA-myší IgG byly pipetovány v duplikátu 100 μ l/jamku. Stejně množství 100 μ l bylo do jamky pipetováno i pro standardy. Destička poté byla inkubována 1 hodinu při 25 °C.

V dalším kroku byla mikrotitrační destička 5 krát promyta roztokem TBS-Tw. Do jamek bylo napipetováno 100 μ l biotinu značeného králičími polyklonárními IgG a to v koncentraci protilátek 0,1 μ g/ml. Inkubace byla opět provedena po dobu 1 hodiny při 25 °C.

Po dalších 5 mycích cyklech bylo do jamek napipetováno 100 μ l streptavidinu značeného křenovou peroxidázou a následovala opět inkubace za stejných podmínek.

Po dalším promytí mikrotitrační destičky bylo do všech jamek pipetováno 100 μ l TMB a reakční směs byla inkubována 10 minut při 25 °C.

Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l kyseliny sírové o 0,2 M koncentraci. Vzniklé žluté zbarvení roztoku bylo fotometricky proměřeno při vlnové délce 450 nm.

9.7. ELISA pro TFF3

Na mikrotitrační jameky byly navázány polyklonární ovčí protilátky proti lidské TFF3. Pro navázání byla připravena směs protilátek s koncentrací 1 µg/ml rozpuštěná v 0,1 M uhličitanovém pufru. Do jamek bylo napipetováno 100 µl protilátkou směsí a mikrotitrační destička byla inkubována přes noc při teplotě 4 °C.

Po inkubaci následovalo promytí destičky roztokem TBS-Tw. Nespecifické vazebné místo bylo blokováno 200 µl roztoku TBS s přídavkem 4 % sacharózy a 0,5 % BSA. Blokace probíhala při 30 minutové inkubaci a 25 °C.

Standardy a naředěné vzorky séra roztokem TBS-Tw-BSA-myší IgG byly pipetovány vždy v duplikátu. Pipetovalo se 100 µl/jamku a inkubace byla provedena 1 hodinu při 25 °C.

Dále byly jamky mikrotitrační destičky 5 krát promyté roztokem TBS-Tw. Do jamek bylo napipetováno 100 µl biotinu značeného ovčími polyklonárními IgG, které měly koncentraci protilátek 0,1 µg/ml. Inkubace byla opět při 25 °C 1 hodinu.

Po následném promytí bylo do jamek napipetováno 100 µl streptavidinu s křenovou peroxidázou a destička se nechala inkubovat opět 1 hodinu při 25 °C.

Po dalších pěti cyklech mytí bylo do všech jamek nadávkováno 100 µl TMB a reakční směs byla inkubována 10 minut při 25 °C.

Reakce byla zastavena přidáním 100 µl 0,2 M kyseliny sírové. Vzniklý barevný roztok byl proměřeno při vlnové délce 450 nm.

9.8. Standardy

Jako standardy byly použity rekombinační TFF od firmy BioVendor. Obsah bílkovin rekombinačních TFF.

Standardy byly pro TFF1 připraveny v koncentracích 4; 2; 1; 0,5; 0,25 a 0,125 µg/l ředícího pufru. Pro TFF2 o koncentracích 10; 5; 2; 1; 0,5 a 0,25 µg/l. Standardy TFF3 byly v koncentracích 2,4; 1,2; 0,6; 0,3; 0,15 a 0,075 µg/l.

Z každého standardu bylo pipetováno 100 µl přímo do jamky.

Také byla stanovena citlivost pro všechny TFF, což je absorbance blanku a tři směrodatné odchylky.

9.9. Přesnost a správnost

Pro ověření spolehlivosti metody ELISA byl proveden test na přesnost a správnost.

U TFF1 bylo pro přesnost a správnost stanovení využito sérum od dvou jedinců s koncentrací 1,1 a 7 µg/l. Ke vzorkům bylo přidáno rostoucí množství rekombinačního proteinu o koncentracích +1; +2 a +4 µg/l. Rovněž bylo testováno sérum od dvou pacientů s koncentracemi TFF1 20,1 a 21,8 µg/l pro zjištění linearitu ředění.

Pro TFF2 byly koncentrace v séru 4,3 a 3,0 µg/l. Metodou standardního přídávku bylo ke vzorku přidáno +2; +5 a +10 µg/l rekombinačního proteinu. Dále se testovaly séra od dvou pacientů s koncentrací TFF2 4,6 a 3,6 µg/l pro ředění linearitu.

Stejným způsobem byla testována správnost a přesnost u TFF3. Volena byla séra jedinců s koncentrací TFF3 1,6 a 2,1 µg/l. K nim bylo přidáno +0,075; +1,5 a +3,0 µg/l rekombinačního proteinu. Pro zjištění linearitu ředění bylo testováno sérum od dvou pacientů s koncentrací TFF3 16,2 a 22,1 µg/l.

Rovněž byla testována intraesejní a interesejní reprodukovatelnost stanovení pro všechny tři TFF.

9.10. Odběry vzorků a výběr probantů

Odběr byl proveden z kubitální vény po 10 min zklidnění a předcházejícím 12-ti hodinovým lačněním v polosedě. Vzorky byly separovány a chlazené centrifuzou při 4 °C a zamrazeny při -80 °C. Pacientky podepsaly informovaný souhlas s vyšetřením.

Bylo vyšetřeno 145 osob, z toho 60 v I. trimestru, 51 ve II. trimestru a 34 ve III. trimestru.

9.11. Měření vzorků

Sérum bylo naředěno 5 krát ředícím pufrům. Takto připravený vzorek byl pipetován přímo do jamek mikrotitrační destičky. Pokud nebylo sérum zpracováno hned po odběru, bylo zamrazeno na -20 °C.

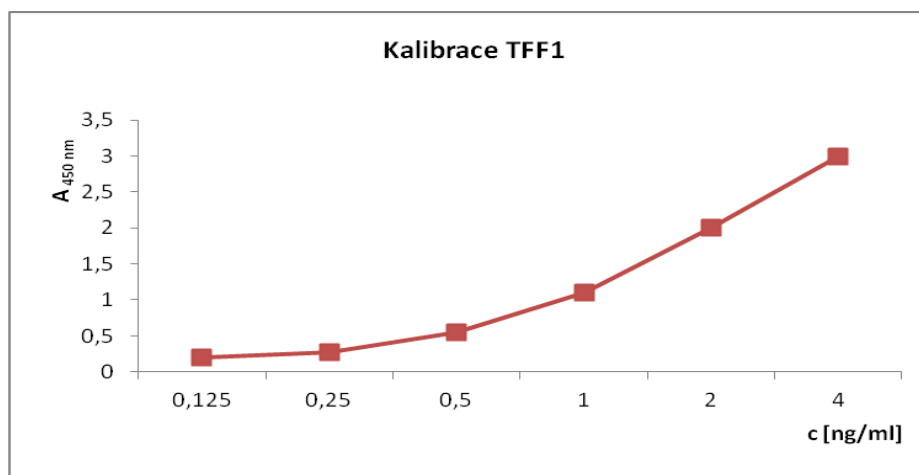
U vzorků byly rovněž měřeny hodnoty HLA-G a transcortinu komerčně dostupnou soupravou ELISA (Biovendor), která má uspokojivé analytické charakteristiky.

Vzorky byly dále doplněny některými screeningovými ukazateli, které se využívají pro odhad vrozených vývojových vady plodu dle trimestru pacientky (AFP, hCG, PAPP-A, hCG beta, uE3).

10. VÝSLEDKY

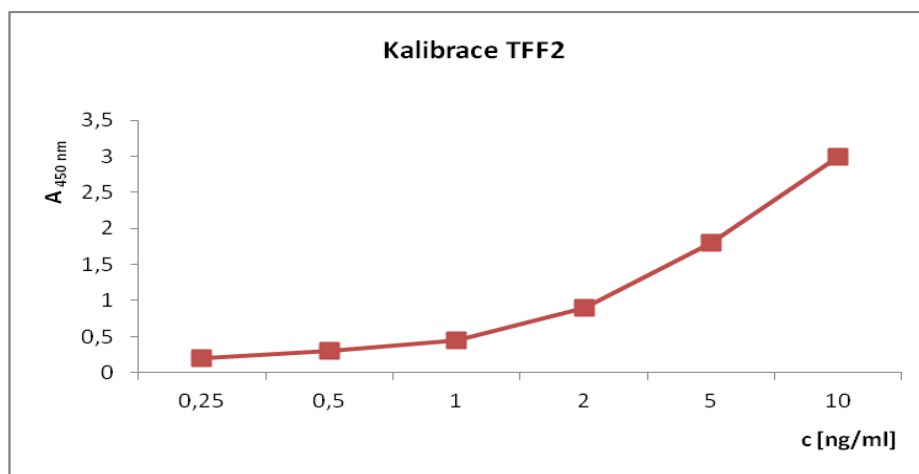
10.1. Měření TFF

10.1.1. Kalibrace pro TFF1



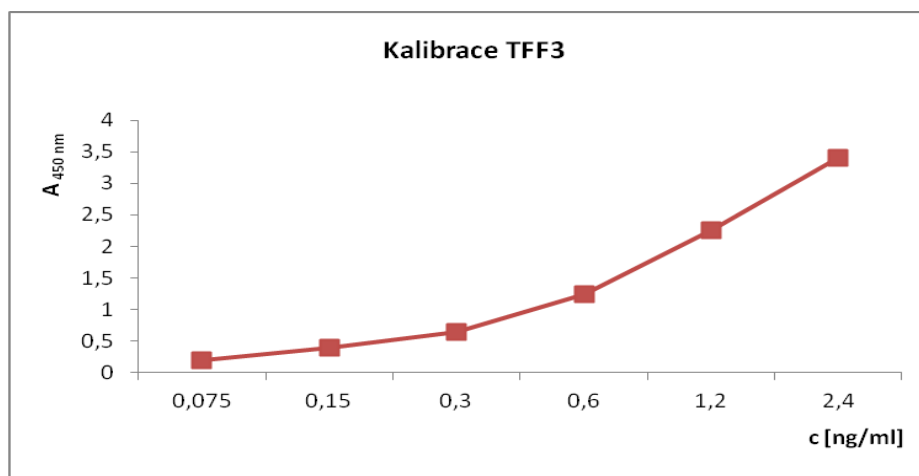
Graf č. 1: Kalibrační křivka pro TFF1 – Křivka má typický tvar. Byl stanoven limit detekce, který je pro TFF1 0,02 $\mu\text{g/l}$.

10.1.2. Kalibrace pro TFF2



Graf č. 2 : Kalibrační křivka pro TFF2 – Kalibrační křivka má typický tvar. Limit detekce pro TFF2 byl stanoven na 0,04 $\mu\text{g/l}$.

10.1.3. Kalibrace pro TFF3



Graf č. 3: Kalibrační křivka pro TFF3 – Graf má typický tvar. Detekční limit pro TFF3 je 0,01 $\mu\text{g/l}$.

10.1.4. Ověření spolehlivosti testu pro TFF1

Tab. č. 1: Výsledky spolehlivosti testu TFF1 v sérii

	Koncentrace [$\mu\text{g/l}$]	SD [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1.	7,88	0,11	9,31
2.	13,47	0,21	8,21

Hodnoty protilehlé přesnosti ve stanovení přesnosti mezi jednotlivými jamkami mikrotitrační destičky v obou případech nižší než 10 %.

Tab. č. 2: Výsledky spolehlivosti testu TFF1 mezi sériemi

	Koncentrace [$\mu\text{g/l}$]	SD [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1.	2,03	0,08	3,95
2.	7,89	0,33	4,22

Při stanovení vzorků mezi jednotlivými destičkami byly variační hodnoty protilehlé přesnosti 3,95 a 4,22 %.

Tab. č. 3: Standardní přídavek pro TFF1

	Naměřené hodnoty [µg/l]	Teoretické hodnoty [µg/l]	CV [%]
1.	1,13	-	-
	1,88	2,13	88,0
	3,13	3,13	100,1
	5,32	5,13	103,7
2.	7,00	-	-
	8,69	8,00	108,6
	9,54	9,00	106,0
	12,42	11,00	112,9

Metodou standardního přídávku byla stanovena přesnost a správnost tohoto testu. Průměrná hodnota je 103 %.

Tab. č. 4: Linearita ředění pro TFF1

	Ředění	Naměřené hodnoty [µg/l]	Teoretické hodnoty [µg/l]	CV [%]
1.	-	18,389	-	-
	2x	9,664	9,19	105,1
	4x	4,575	4,60	99,5
	8x	2,139	2,30	93,1
2.	-	19,194	-	-
	2x	10,053	9,60	104,8
	4x	4,939	4,80	102,9
	8x	2,271	2,40	94,7

Linearitou ředění byla určena přesnost a správnost, která v průměru byla 100%.

10.1.5. Ověření spolehlivosti testu pro TFF2

Tab. č. 5: Výsledky spolehlivosti testu TFF2 v sérii

	Koncentrace [µg/l]	SD [µg/l]	CV [%]
1.	23,56	0,14	3,15
2.	9,02	0,15	9,04

U prvního vzorku byly hodnoty protilehlé přesnosti mezi jednotlivými stanoveními v mikrotitračních jamkách 3,15 % a u druhého 9,04 %.

Tab. č. 6: Výsledky spolehlivosti testu TFF2 mezi sériemi

	Koncentrace [$\mu\text{g/l}$]	SD [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1.	23,78	0,89	3,75
2.	8,77	0,47	5,31

Jednotlivá stanovení testovaná na různých mikrotitračních destičkách ukázaly hodnoty protilehlé přesnosti prvního vzorku 3,75 % a druhého 5,31 %.

Tab č. 7: Standardní přídavek pro TFF2

	Naměřené hodnoty [$\mu\text{g/l}$]	Teoretické hodnoty [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1.	4,31	-	-
	6,36	6,31	100,8
	9,27	9,31	99,5
	15,58	14,31	108,9
2.	3,01	-	-
	4,91	5,01	98,0
	7,97	8,01	99,5
	14,04	13,01	108,0

Průměrná přesnost testu s použitím metody standardního přídávku byla 103 %.

Tab. č. 8: Linearita ředění pro TFF2

	Ředění	Naměřené hodnoty [$\mu\text{g/l}$]	Teoretické hodnoty [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1.	-	4,594	-	-
	2x	2,074	2,30	90,2
	4x	1,004	1,15	87,4
	8x	0,61	0,57	106,2
2.	-	3,598	-	-
	2x	1,607	1,80	89,3
	4x	0,818	0,90	90,7
	8x	0,512	0,45	113,8

Průměrná reprodukovatelnost linearity ředění je 96 %.

10.1.6. Ověření spolehlivosti testu pro TFF3

Tab. č. 9: Výsledky spolehlivosti testu TFF3 v sérii

	Koncentrace [$\mu\text{g/l}$]	SD [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1.	1,18	0,07	5,6
2.	7,11	0,54	7,6

Stanovení mezi jednotlivými jamkami mikrotitrační destičky je u prvního vzorku 5,6 % a u druhého 7,6 %.

Tab. č. 10: Výsledky spolehlivosti testu TFF3 mezi sériemi

	Koncentrace [$\mu\text{g/l}$]	SD [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1.	1,57	0,10	6,4
2.	8,77	0,66	7,5

Stanovení mezi různými mikrotitračními destičkami prokázalo hodnoty protilehlé přesnosti 6,4 a 7,5 %.

Tab. č. 11: Standardní přídavek pro TFF3

	Naměřené hodnoty [$\mu\text{g/l}$]	Teoretické hodnoty [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1.	1,56	-	-
	4,78	4,56	104,8
	3,10	3,06	101,3
	2,25	2,31	97,4
2.	2,11	-	-
	5,29	5,11	103,5
	3,71	3,41	102,8
	3,04	2,86	106,3

Metodou standardního přídávku byla zjištěna přesnost a správnost testu 103 %.

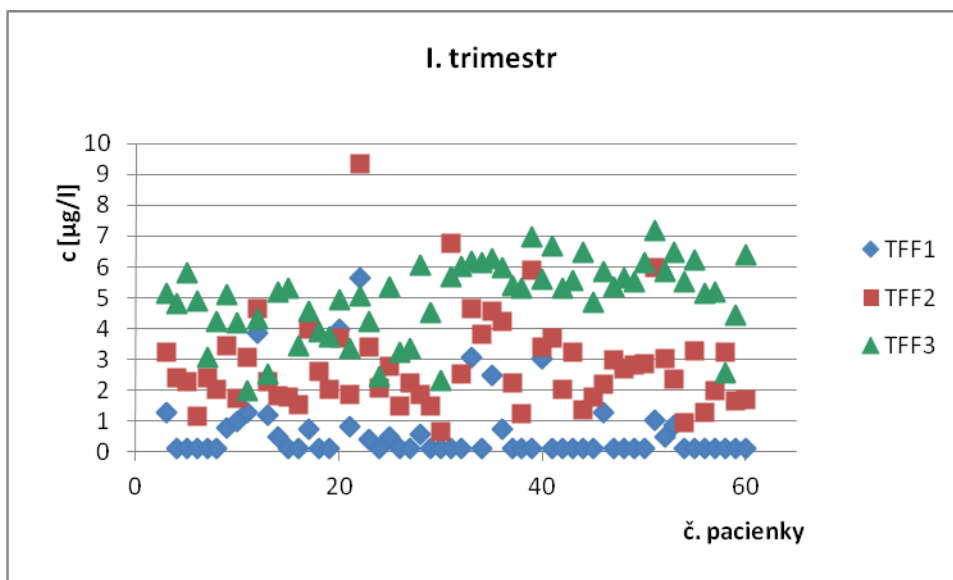
Tab. č. 12: Linearita ředění pro TFF3

	Ředění	Naměřené hodnoty [µg/l]	Teoretické hodnoty [µg/l]	CV [%]
1.	-	16,24	-	-
	2x	8,24	8,12	101,5
	4x	3,52	4,06	86,7
	8x	1,96	2,03	96,6
2.	-	22,8	-	-
	2x	10,28	11,4	93,1
	4x	5,56	5,52	100,7
	8x	2,52	2,76	91,3

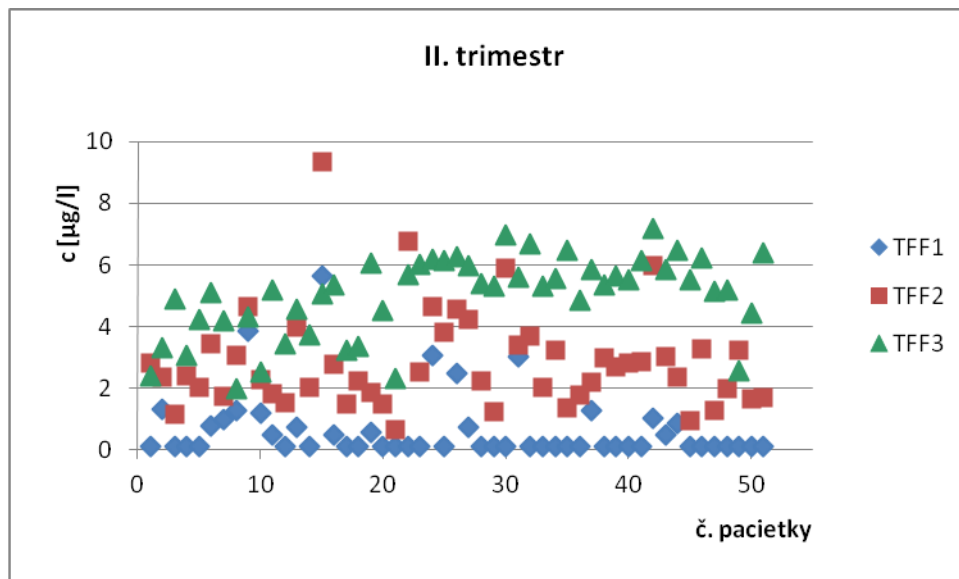
Linearitou ředění bylo zjištěno, že variační koeficient jednotlivých stanovení je průměrně 95 %.

10.2. Testování těhotných osob

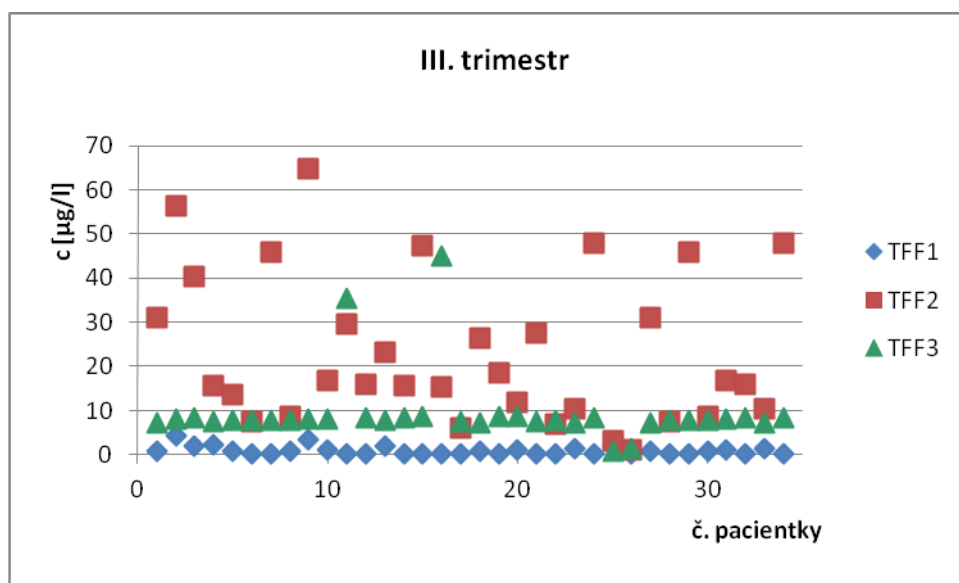
Bylo testováno 165 žen průměrného věku 31 ± 2 let.



Graf č. 4: Koncentrace všech tří TFF v prvním trimestru.



Graf č. 5: Koncentrace všech tří TFF ve druhém trimestru.



Graf č. 6: Koncentrace všech tří TFF ve třetím trimestru.

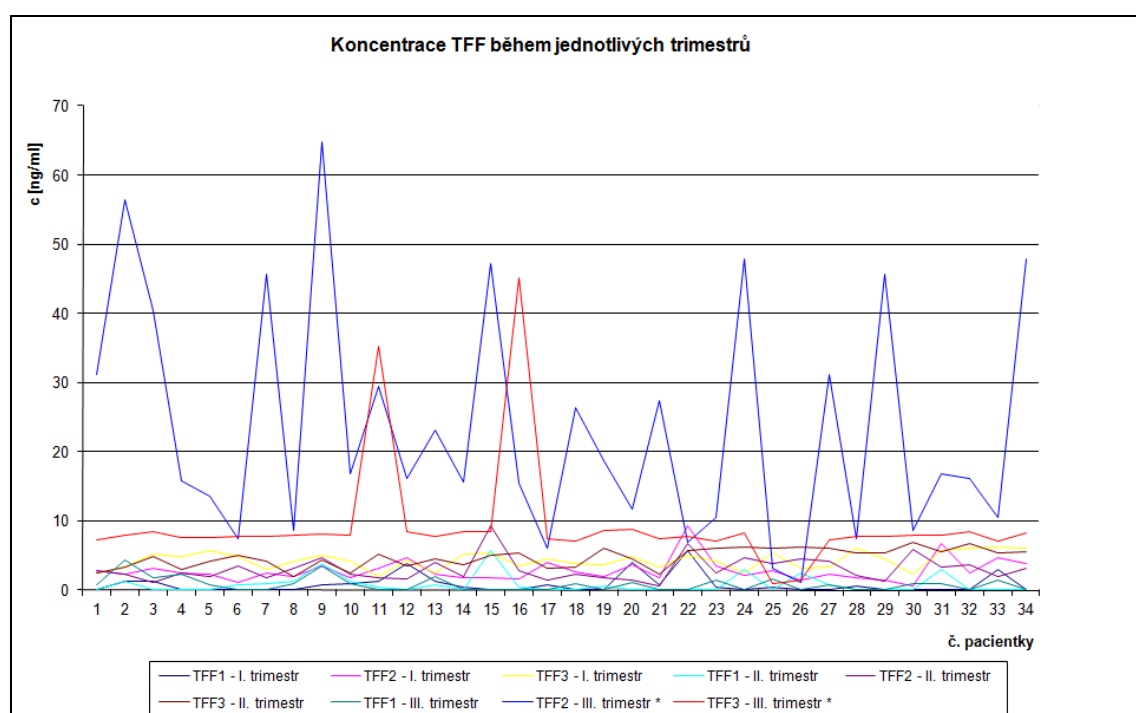
Hodnoty TFF1 se během jednotlivých trimestrů významně neměnily ($p = 0,463$).

V prvním trimestru byly koncentrace TFF2 a TFF3 velmi podobné a nacházejí se v rozmezí 2 – 6 µg/l.

Ve druhém trimestru se hodnoty TFF2 a TFF3 nijak výrazně neměnily. Statisticky nevýznamný vzestup ($p = 0,7387$) oproti prvnímu trimestru je naznačen v koncentracích TFF3.

Během třetího trimestru významně stoupala koncentrace TFF2 a to až k dvojciferným hodnotám ($p < 0,01$, Graf č. 6, průměr $2,85 \mu\text{g/l}$ vs. průměr $23 \mu\text{g/l}$), jejichž průměrná hodnota je okolo $23 \mu\text{g/l}$. Hodnoty TFF3 rovněž statisticky významně stoupaly ($p < 0,01$; průměr $4,99$ vs. Průměr $9,39$). Koncentrace TFF3 se pohybovaly okolo $9,39 \mu\text{g/l}$ (Graf č. 6, Tab. č. 45)

Největších statisticky významných rozdílů v koncentracích během jednotlivých trimestrů bylo dosaženo u TFF2 a poté i významné TFF3. Koncentrace TFF1 se během průběhu těhotenství významně neměnily.



Graf č. 7: Koncentrace TFF během jednotlivých trimestrů – Z grafu jsou zřejmé, stoupající koncentrace TFF2 a TFF3 během III. trimestru, které jsou statisticky významné.

10.3. Vzorky a statistika

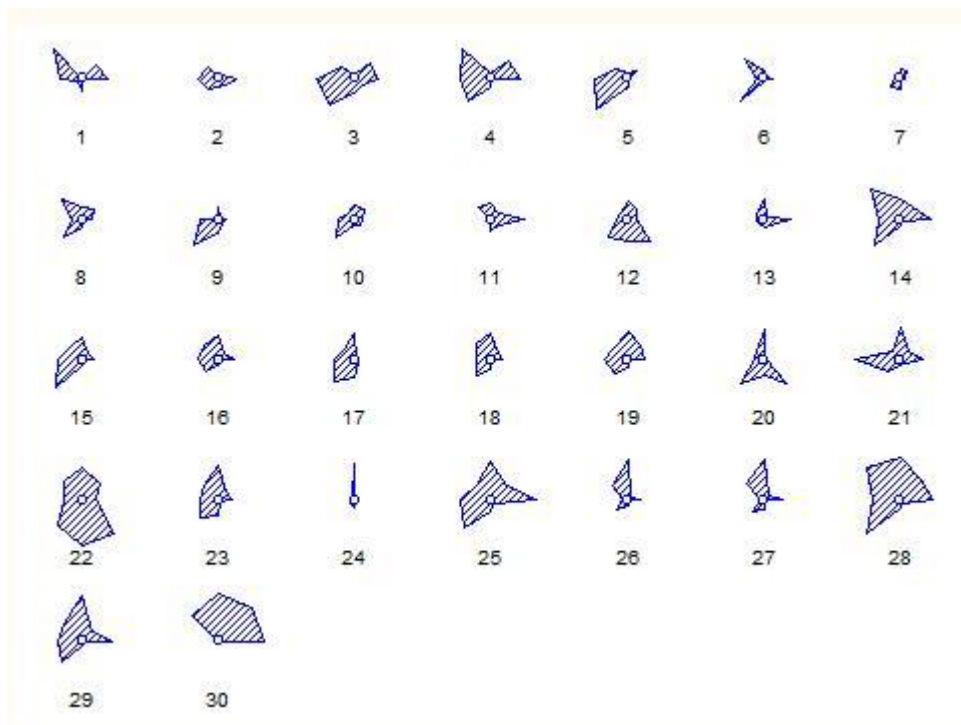
10.3.1. První trimestr

10.3.1.1. Data I.

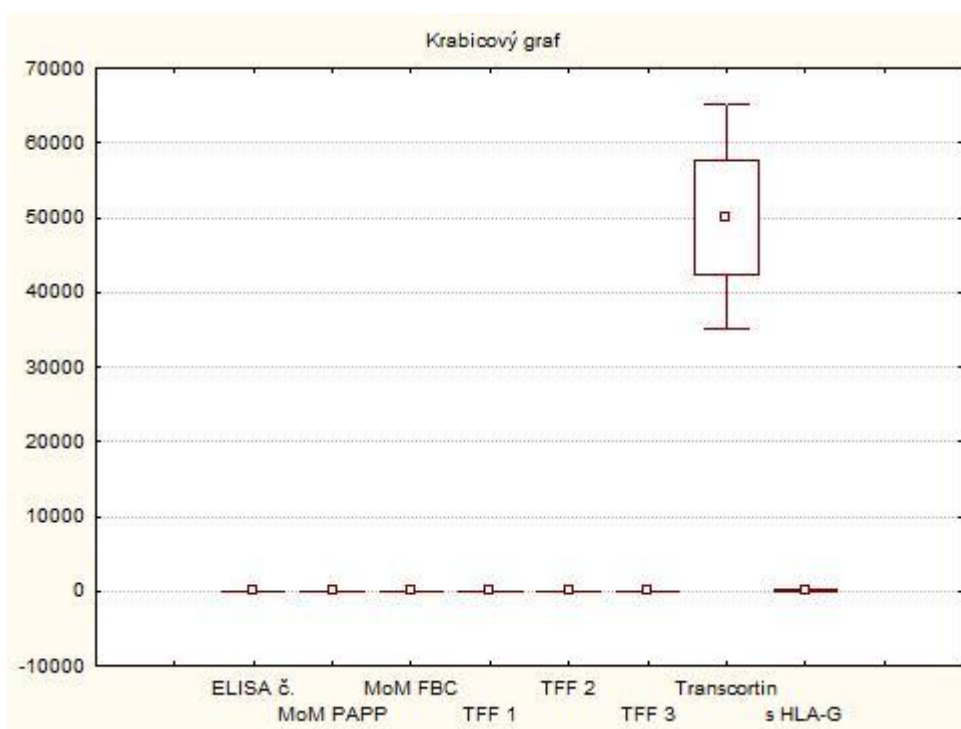
Tab. č. 13: Naměřená data (Tab. byla doplněna o další data týkající se daného vzorku)

ELISA číslo	MoM PAPP	MoM FBC	TTF 1 µg/l	TTF 2 µg/l	TTF3 µg/l	Transcortin µg/l	s HLA-G µg/l
1	1,500	1,460	0,115	2,805	2,400	53130	116,656
2	0,580	1,070	1,318	2,342	3,310	51750	56,047
3	1,700	1,390	1,261	3,231	5,145	63390	59,970
4	1,860	1,650	0,100	2,398	4,805	59030	117,922
5	1,010	0,260	0,100	2,268	5,800	60330	54,373
6	0,520	0,650	0,100	1,138	4,880	43730	84,379
7	0,910	0,440	0,100	2,416	3,060	42010	21,796
8	1,240	0,700	0,100	2,009	4,215	44850	86,669
9	0,520	0,610	0,798	3,435	5,120	50290	18,344
10	1,100	0,610	1,005	1,731	4,185	49020	40,095
11	0,870	1,860	1,261	3,083	1,975	38300	59,370
12	1,160	0,660	3,868	4,662	4,330	45290	41,065
13	0,500	1,520	1,215	2,268	2,505	43680	40,581
14	1,330	1,740	0,480	1,806	5,190	52740	119,188
15	0,900	0,790	0,100	1,787	5,320	54150	62,811
16	0,840	1,010	0,100	1,546	3,440	51420	69,020
17	0,440	0,410	0,722	3,992	4,565	52690	52,996
18	0,930	0,760	0,100	2,602	3,885	47670	71,802
19	1,500	1,020	0,100	2,028	3,715	53750	62,662
20	0,420	0,350	4,000	3,676	4,950	44360	45,533
21	1,080	1,320	0,827	1,843	3,375	69240	46,635
22	1,820	0,940	5,661	9,360	5,050	50990	83,662
23	1,000	0,890	0,398	3,417	4,230	50390	68,432
24	0,320	0,260	0,100	2,083	2,460	39780	27,260
25	1,540	2,360	0,500	2,768	5,350	58430	67,844
26	0,610	0,860	0,100	1,491	3,230	41210	68,579
27	0,750	1,140	0,100	2,250	3,375	40750	76,167
28	2,010	1,840	0,573	1,843	6,065	56630	130,443
29	1,080	1,700	0,100	1,491	4,510	54540	77,904
30	3,100	2,450	0,100	0,635	2,300	38520	107,224

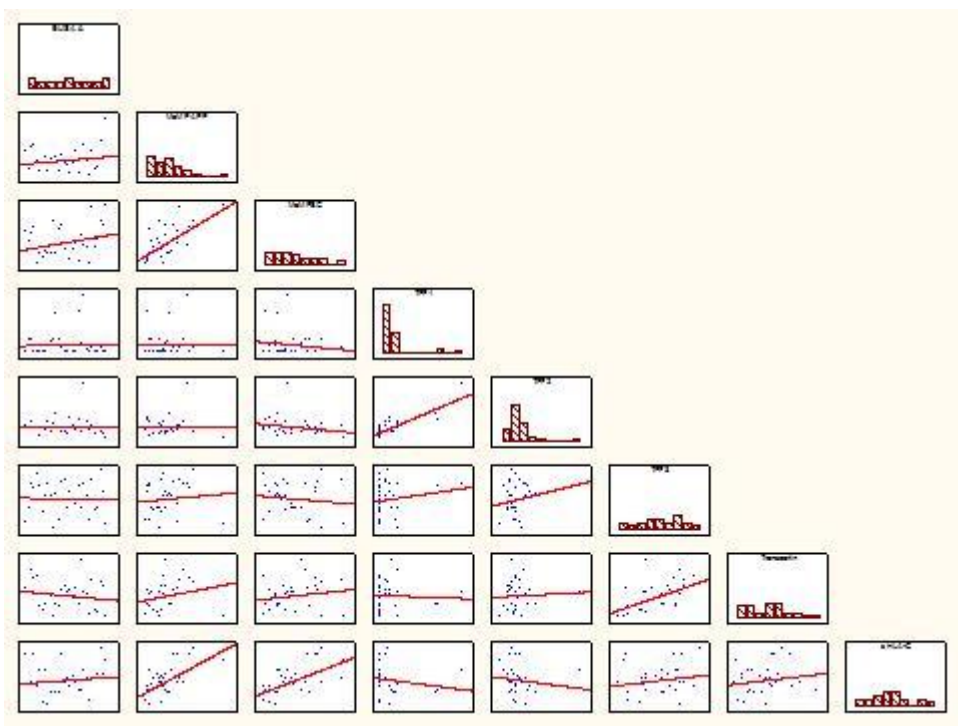
10.8.1.1. Exploratorní analýza dat



Graf č. 8: Ikonové grafy - mnohoúhelníky: Na ikonových grafech je vidět, že případy nejsou totožné.



Graf č. 9: Krabicový graf – Z krabicového grafu je vidět symetrické rozdělení dat.



Graf č. 10: Maticový diagram korelace znaků - Vysoké hodnoty korelačního koeficientu porovnání dvojice znaků vedou k lineární závislosti. Téměř na všech diagramech je viditelná téměř lineární závislost, tudíž data jsou korelovaná.

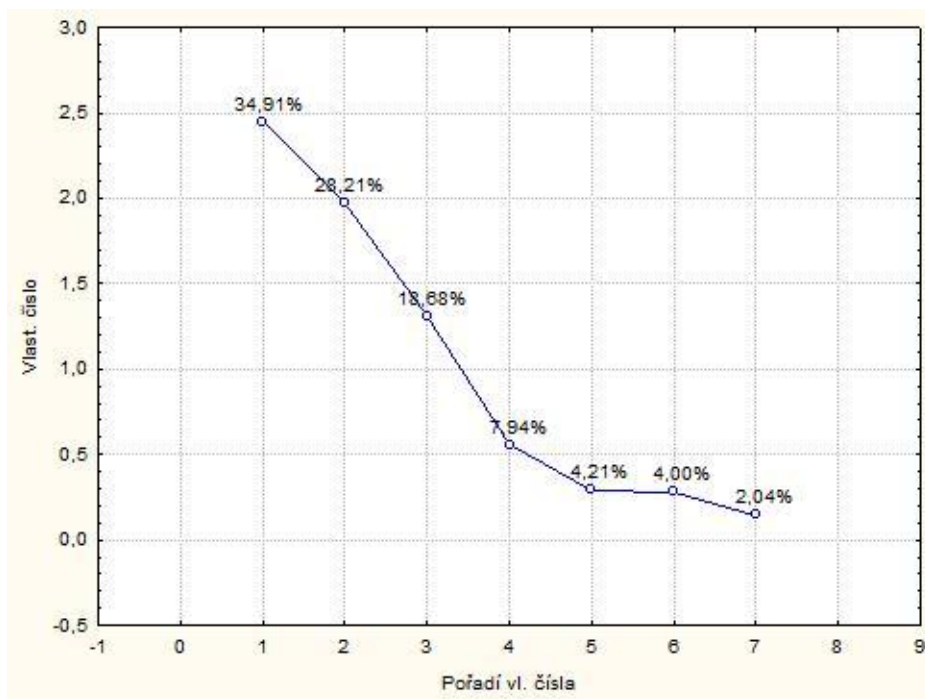
10.8.1.1.2. Analýza hlavních komponent

Tab č. 14: Korelační matice

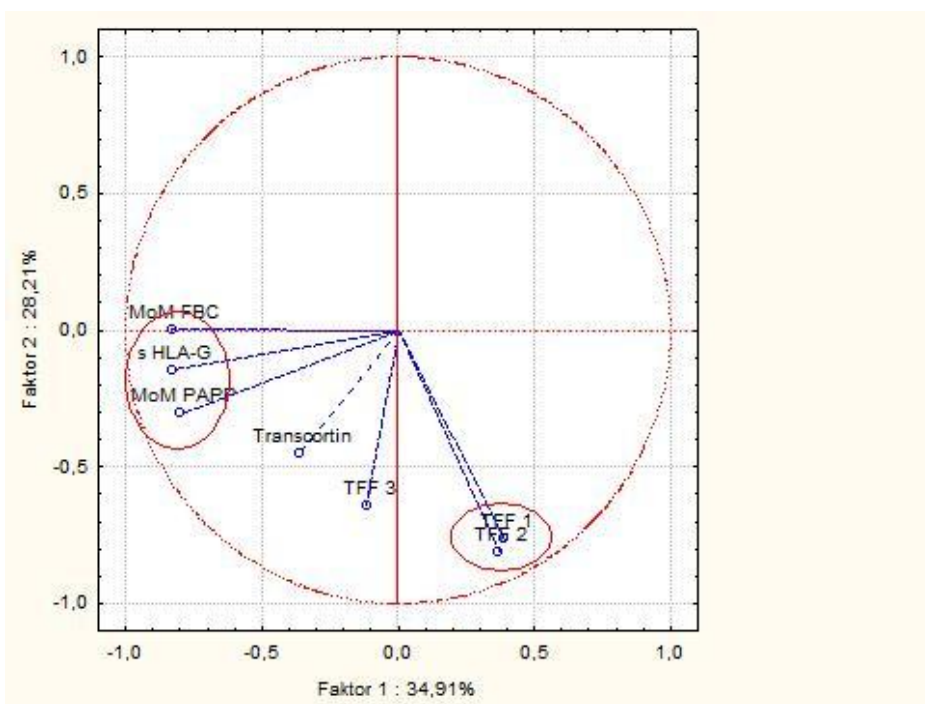
Proměnná	MoM PAPP	MoM FBC	TFF 1	TFF 2	TFF 3	Transcortin	s HLA-G
MoM PAPP	1,000000	0,658852	0,019081	0,026906	0,099367	0,231648	0,637067
MoM FBC	0,658852	1,000000	-0,156784	-0,205463	-0,122776	0,170260	0,589409
TFF 1	0,019081	-0,156784	1,000000	0,827873	0,185911	-0,054001	-0,176851
TFF 2	0,026906	-0,205463	0,827873	1,000000	0,221528	0,052376	-0,128762
TFF 3	0,099367	-0,122776	0,185911	0,221528	1,000000	0,542904	0,177994
Transcortin	0,231648	0,170260	-0,054001	0,052376	0,542904	1,000000	0,162746
s HLA-G	0,637067	0,589409	-0,176851	-0,128762	0,177994	0,162746	1,000000

Tak č. 15: Kovariační matice

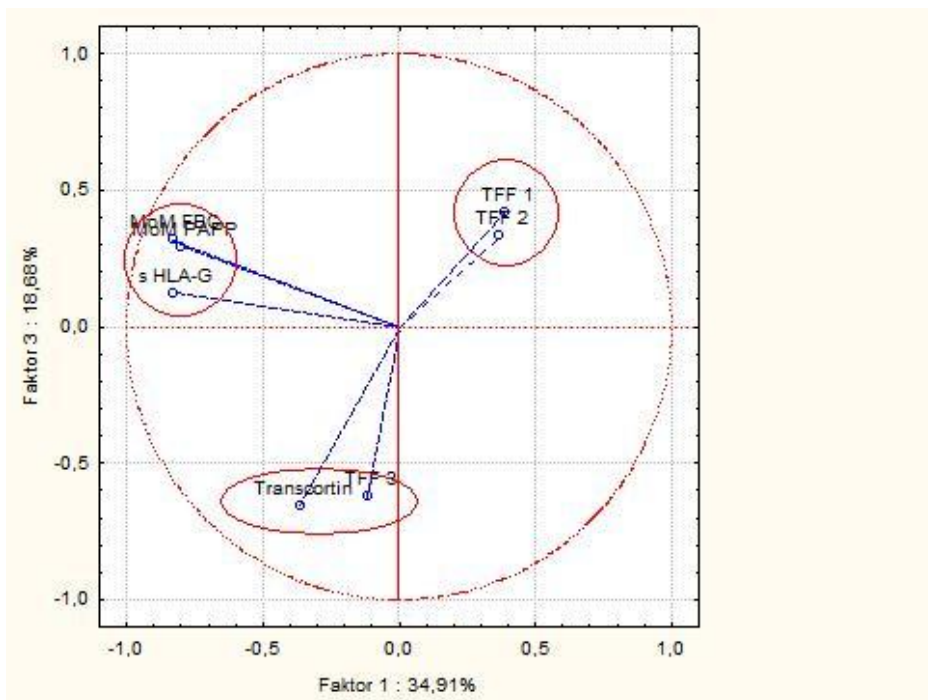
Proměnná	MoM PAPP	MoM FBC	TFF 1	TFF 2	TFF 3	Transcortin	s HLA-G
MoM PAPP	0,355	0,2341	0,015	0,0248	0,066	1057	10,96
MoM FBC	0,234	0,3559	-0,125	-0,1895	-0,082	778	10,15
TFF 1	0,015	-0,1251	1,788	1,7114	0,278	-553	-6,83
TFF 2	0,025	-0,1895	1,711	2,3895	0,383	620	-5,75
TFF 3	0,066	-0,0820	0,278	0,3834	1,253	4655	5,75
Transcortin	1056,869	777,9733	-553,132	620,1269	4655,405	58665122	35997,76
s HLA-G	10,959	10,1544	-6,830	-5,7480	5,755	35998	833,97



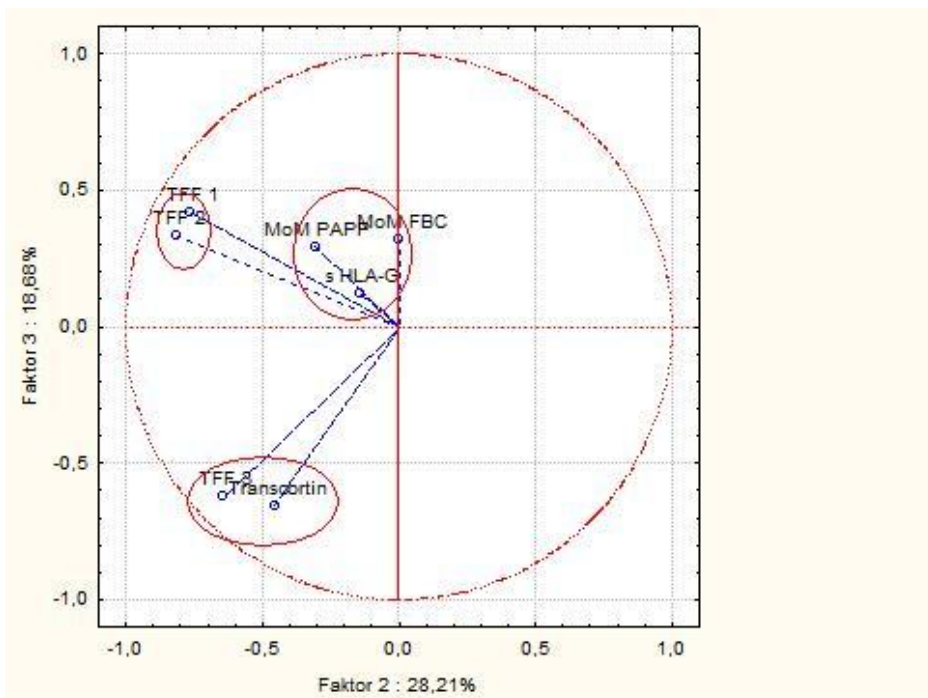
Graf č. 11: Cattelův graf vlastních čísel - Cattelův graf určuje redukci počtu proměnných, které postačí k analýze dat. Funkcí je zjednodušení analýzy. Pro tento případ stačí využít tři proměnné, aby bylo dosaženo 81,8% statistické variability.



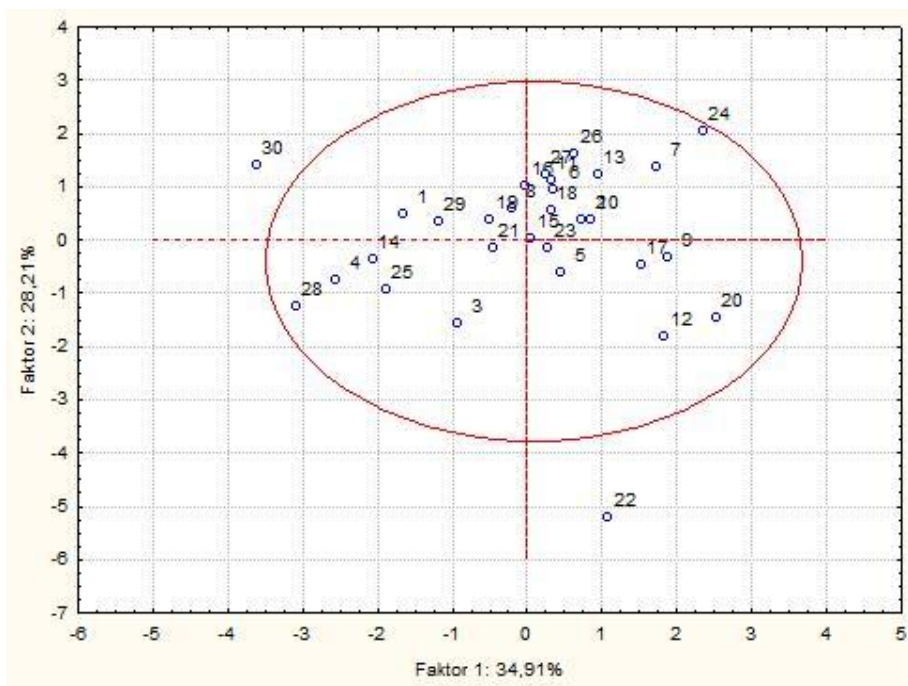
Graf č. 12: Graf komponentních vah 1 a 2 – Znaky lze rozdělit do 2 skupin. První tvoří TFF1 a TFF2, které leží blízko sebe a jsou silně koreloována. Druhou skupinu tvoří MoM FBC, MoM PAPP a s HLA-G. Znaky Transcortin a TFF3 nelze zařadit do žádné skupiny.



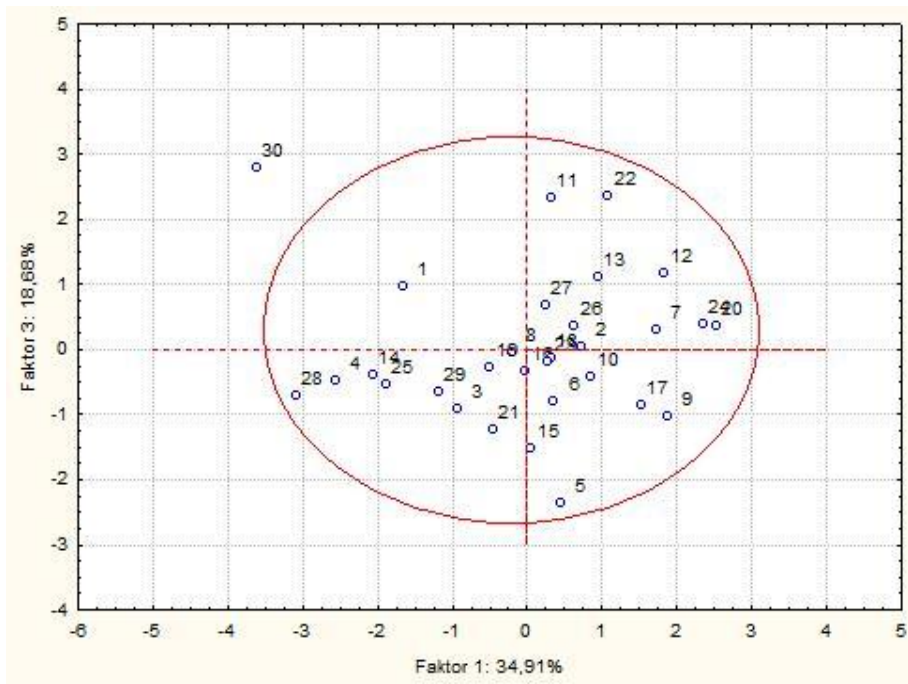
Graf č. 13: Graf komponentních vah 1 a 3 - Znaky lze rozdělit do 3 skupin. První tvoří TFF1 a TFF2, které leží velmi blízko u sebe a mají pozitivní korelaci, druhou skupinu tvoří MoM FBC, MoM PAPP a s HLA-G. Znaky Trascortin a TFF3 tvoří třetí skupinu.



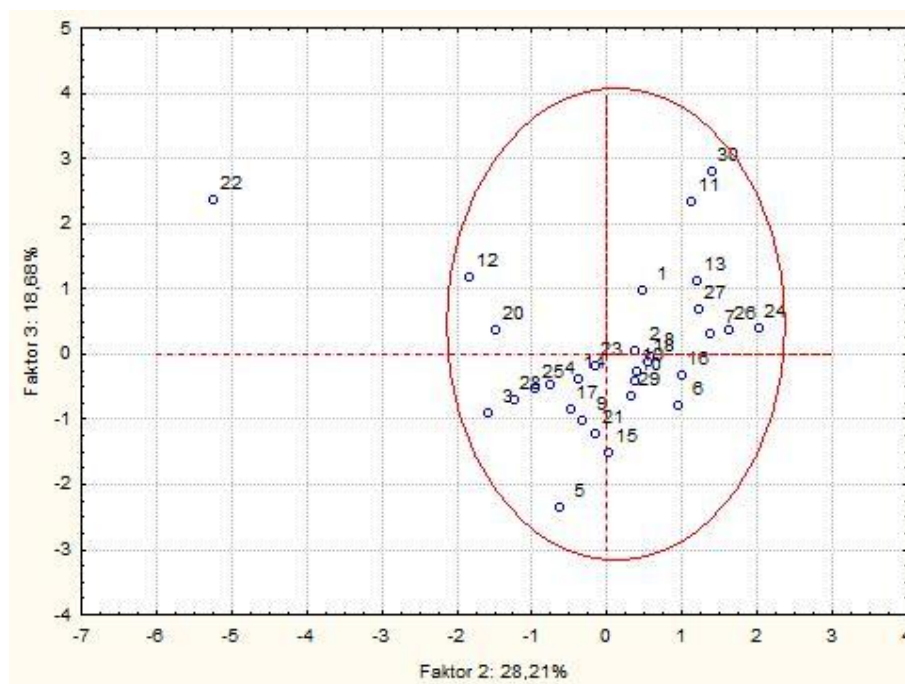
Graf č. 14: Graf komponentních vah 2 a 3 - Znaky lze rozdělit do 3 skupin. První tvoří TFF1 a TFF2, druhou skupinu tvoří MoM FBC, MoM PAPP a s HLA-G. Znaky Trascortin a TFF3 tvoří třetí skupinu.



Graf č. 15: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 2) - Případy tvoří jeden velký shluk, vybočující body 22 a 30 lze považovat za odlehlé body.



Graf č. 16: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 3) - Případy tvoří jeden velký shluk, za odlehlý bod, který ve shluku neleží lze považovat 30.



Graf č. 17: Rozptylový diagram komponentního skóre (2 a 3) - Případy tvoří jeden velký shluk, vybočující bod 22 lze považovat za odlehlý bod.

10.8.1.1.3. Faktorová analýza

Tab č. 16: Průměrné hodnoty

Proměnná	Průměry	Sm.Odch.
MoM PAPP	1,10	0,596
MoM FBC	1,09	0,597
TFF 1	0,85	1,337
TFF 2	2,61	1,546
TFF 3	4,09	1,120
Transcortin	50068,67	7659,316
s HLA-G	67,85	28,879

Sm. Odch. – směrodatná odchylka

Tab č. 17: Faktorové zátěže

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
MoM PAPP	-0,797383	-0,304408	0,293463
MoM FBC	-0,829576	0,001856	0,315806
TFF 1	0,392026	-0,765527	0,420166
TFF 2	0,370722	-0,810282	0,332900
TFF 3	-0,115572	-0,641381	-0,623442
Transcortin	-0,363554	-0,454733	-0,655948
s HLA-G	-0,826669	-0,144992	0,124195
Výkl.roz	2,444046	1,974430	1,307587
Prp.celk	0,349149	0,282061	0,186798

Tab č. 18: Reziduální korelace

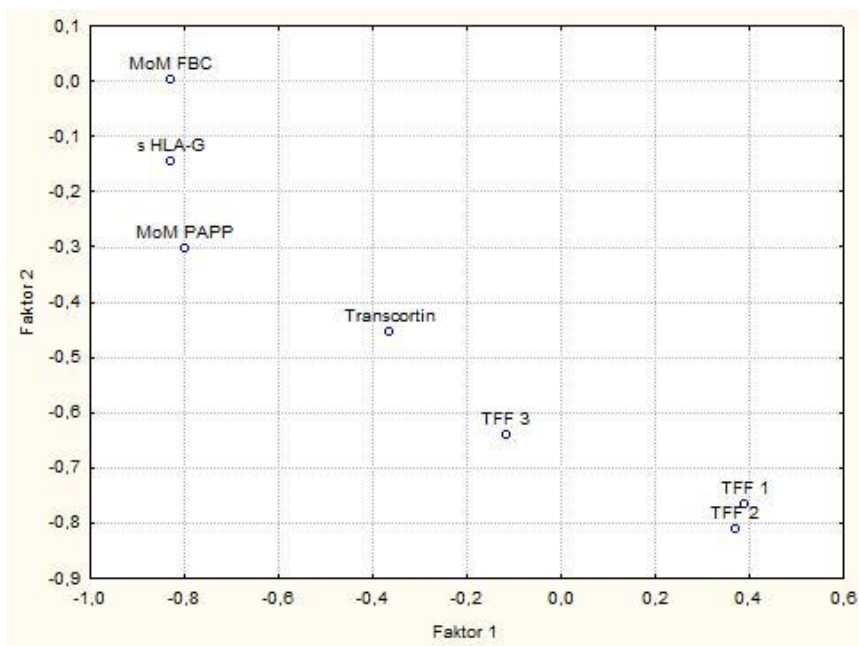
Proměnná	MoM PAPP	MoM FBC	TFF 1	TFF 2	TFF 3	Transcortin	s HLA-G
MoM PAPP	0,81	0,75	0,04	0,05	0,10	0,24	0,74
MoM FBC	0,75	0,79	-0,19	-0,20	-0,10	0,09	0,72
TFF 1	0,04	-0,19	0,92	0,91	0,18	-0,07	-0,16
TFF 2	0,05	-0,20	0,91	0,90	0,27	0,02	-0,15
TFF 3	0,10	-0,10	0,18	0,27	0,81	0,74	0,11
Transcortin	0,24	0,09	-0,07	0,02	0,74	0,77	0,29
s HLA-G	0,74	0,72	-0,16	-0,15	0,11	0,29	0,72

Tab č. 19: Koeficienty faktorového skóre

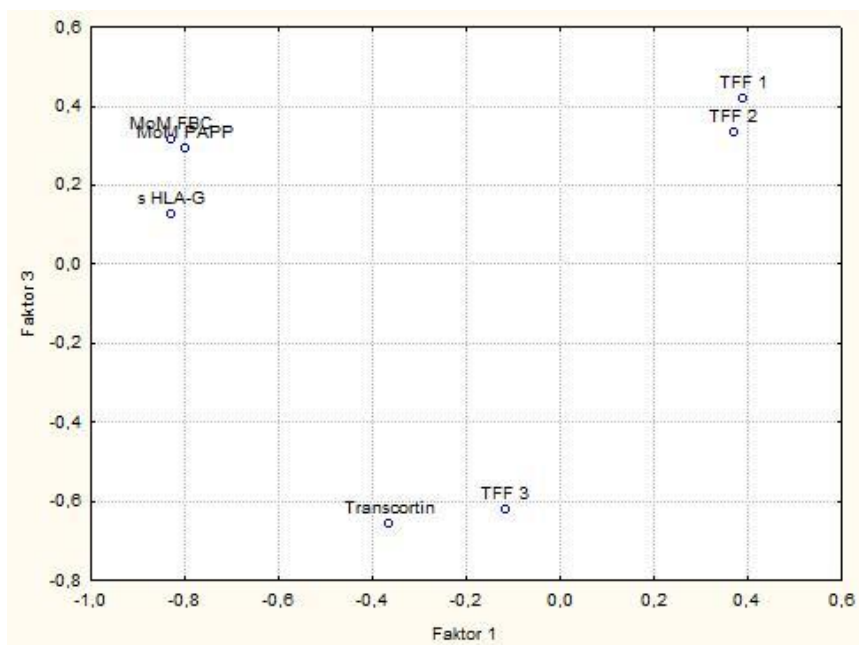
Proměnná	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
MoM PAPP	-0,326255	-0,154175	0,224431
MoM FBC	-0,339427	0,000940	0,241518
TFF 1	0,160400	-0,387721	0,321329
TFF 2	0,151684	-0,410388	0,254591
TFF 3	-0,047287	-0,324843	-0,476788
Transcortin	-0,148751	-0,230311	-0,501647
s HLA-G	-0,338238	-0,073435	0,094980

Graf č. 20: Faktorové skóre

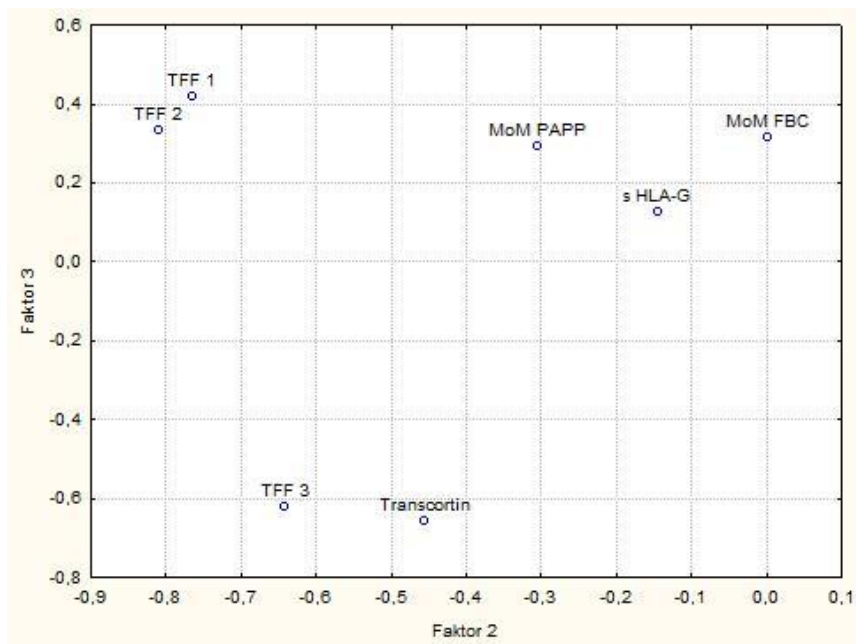
Případ	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	15	0,04034	0,02199	-1,32150
1	-1,05532	0,33414	0,83452	16	-0,01592	0,71364	-0,29487
2	0,46757	0,27737	0,04630	17	0,97467	-0,33735	-0,75117
3	-0,59705	-1,12393	-0,80039	18	0,20210	0,38616	-0,12301
4	-1,63333	-0,52479	-0,43004	19	-0,31820	0,28118	-0,25340
5	0,28737	-0,43866	-2,05234	20	1,61484	-1,04098	0,30965
6	0,23278	0,67857	-0,68747	21	-0,28856	-0,09767	-1,06841
7	1,10733	0,97695	0,26685	22	0,68975	-3,71832	2,05981
8	-0,12504	0,41451	-0,03511	23	0,17758	-0,10784	-0,17433
9	1,20054	-0,23265	-0,90668	24	1,50487	1,44503	0,33639
10	0,54989	0,26377	-0,36615	25	-1,20257	-0,66780	-0,46363
11	0,20381	0,80669	2,04411	26	0,40233	1,15660	0,30537
12	1,17453	-1,29223	1,03307	27	0,15475	0,87176	0,58982
13	0,60761	0,86385	0,98191	28	-1,97458	-0,87837	-0,61259
14	-1,31569	-0,26627	-0,34732	29	-0,75519	0,24034	-0,56497
				30	-2,31123	0,99434	2,44560



Graf č. 18: Graf faktorových vah 1,2 – Faktor 1 ukazuje na jeden faktorově čistý znak MoM FBC s kladnou hodnotou faktorové váhy, zatímco zápornou hodnotu faktorové váhy mají znaky TFF1 a TFF2. Což znamená, že hodnota znaků roste s klesající hodnotou faktoru 1.

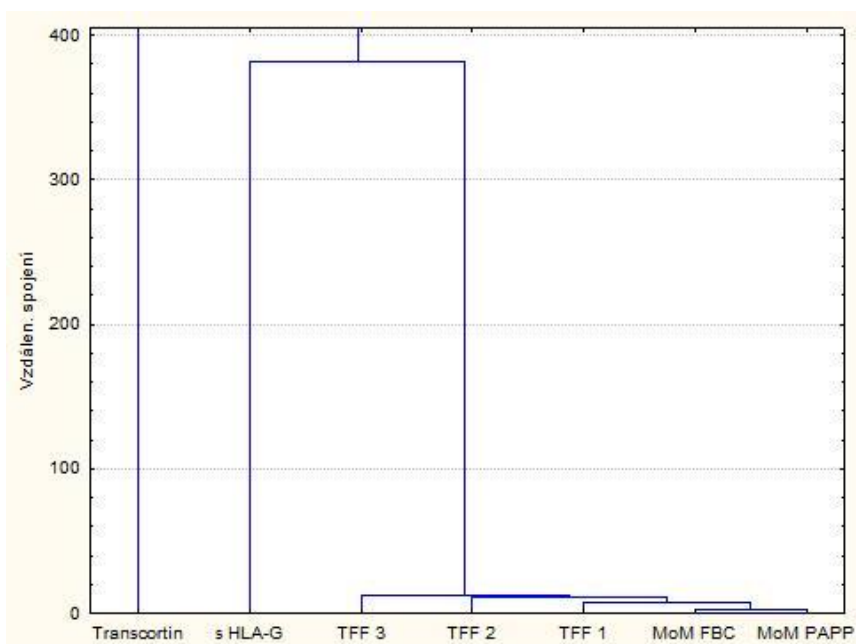


Graf č. 19: Graf faktorových vah 1, 3 – Faktor 1 ukazuje na faktorově čisté znaky MoM FBC, MoM PAPP, s kladnou hodnotou faktorové váhy. Zápornou hodnotu faktorové váhy mají znaky transcortin a TFF3. Což znamená, že hodnota znaků roste s klesající hodnotou faktoru 1. U faktoru 3 mají kladnou hodnotu faktorových vah TFF1 a TFF2.



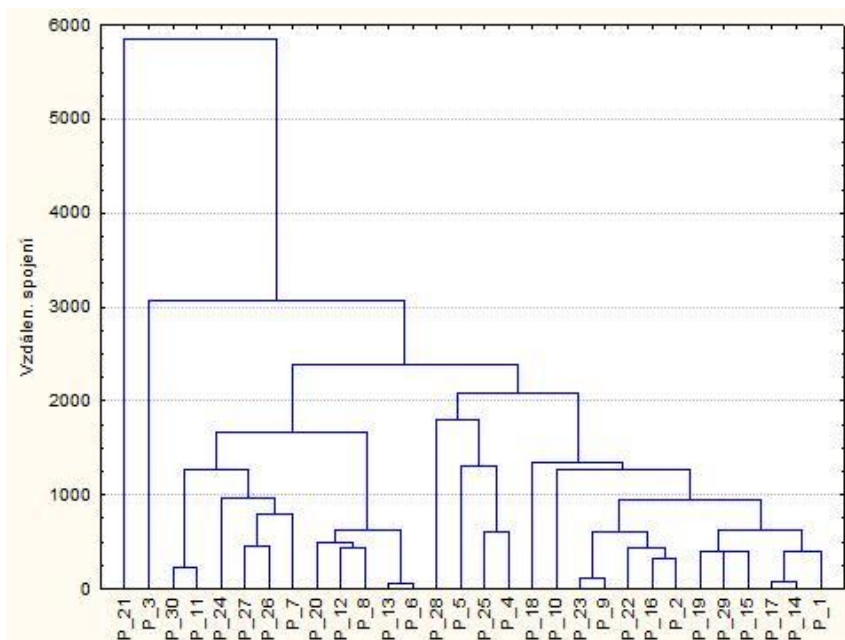
Graf č. 20: Graf faktorových vah 2, 3 – Faktor 2 ukazuje na faktorově čisté znaky TFF1 a TFF2, s kladnou hodnotou faktorové váhy. U faktoru 3 mají kladnou hodnotu faktorových vah znaky MoM PAPP, HLA-G a MoM FBC. Zápornou hodnotu faktorových vah mají transcortin a TFF3, což znamená, že hodnota znaků roste s klesající hodnotou faktoru 3.

10.8.1.1.4. Analýza shluků



Graf č. 21: Třásňový graf – znaky - Nejpodobnější znaky jsou MoM FBC a MoM PAPP (skupina 1), dále se připojuje TFF1 (skupina 2), v další rovině TFF2 (skupina 3),

nakonec se připojuje TFF3 (skupina 4). Na celou skupinu dále nasedá s HLA-G (skupina 5). Znak, který na ostatní navazuje jako poslední je transcortin, který je k ostatním buď v silně negativní korelaci, nebo s nimi nekoreluje vůbec a je k výše uvedeným znakům nejméně podobný.



Graf č. 22: Třásňový graf – případy - Třásňový graf případů je nepřehledný. Opět dochází k rozdělení podobných případů do skupin.

10.8.1.1.5. Shrnutí statistiky

Z maticového diagramu (Graf č. 10) je patrná lineární závislost a rozněž symetrické rozdělení, které potvrzují i krabicové grafy (Graf č. 9).

Z Cattelova grafu (Graf č. 11) je vidět, že stačí využít jen 3 proměnné a i tak bude dosaženo 81,8 % statistické variability.

Z grafů komponentních vah (Grafy č. 12, 13, 14) je vidět podobnost a korelace mezi TFF1 a TFF2. Rovněž si jsou podobné MoM FBC, PAPP a HLA-G.

Z rozptylových diagramů komponentních vah (Grafy č. 15, 16, 17) je patrné, že v případech se nacházejí dva odlehlé body a to 22 a 30.

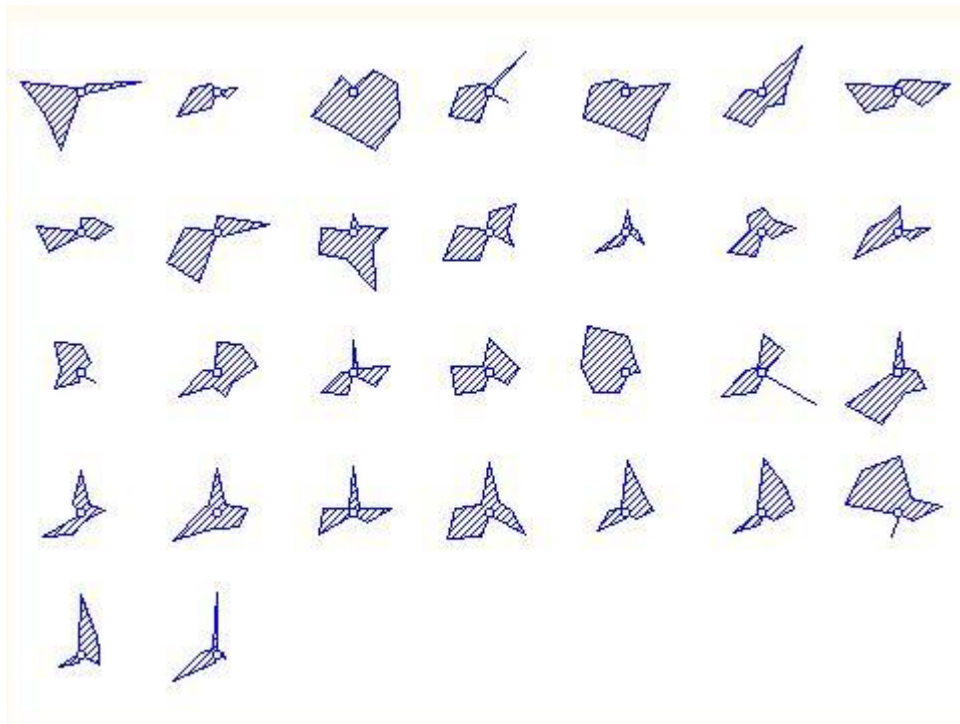
Analýzou shluků (Graf č. 21) byla nalezena největší souvislost mezi znaky MoM FBC a PAPP. Rovněž bylo prokázáno, že všechny tři TFF se nacházejí na jedné větvi třásňového grafu.

10.3.1.2. Data II.

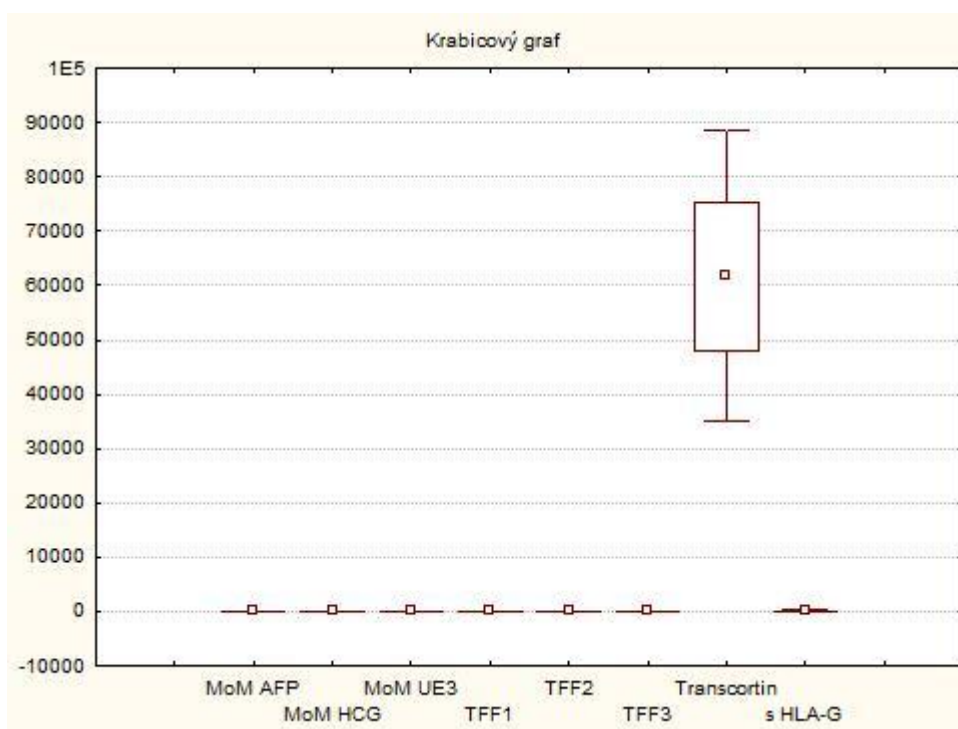
Tab. č. 21: Naměřená data (Tab. byla doplněna o další data týkající se daného vzorku)

ELISA číslo	MoM AFP	MoM HCG	MoM UE3	TTF 1	TTF 2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
				µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
1	0,800	2,200	0,660	0,100	6,759	5,675	91880	40,581
2	0,640	0,960	0,940	0,100	2,527	6,000	60270	61,767
3	1,360	1,700	2,010	3,062	4,662	6,180	58120	110,464
4	2,030	0,350	1,170	0,100	3,825	6,130	65710	69,020
5	0,680	1,680	1,440	2,494	4,550	6,250	69310	90,093
6	2,230	1,030	1,260	0,753	4,233	5,990	55000	14,082
7	1,010	1,890	1,340	0,100	2,213	5,395	86450	49,602
8	1,080	1,310	1,030	0,100	1,249	5,320	77290	21,796
9	1,050	1,930	0,810	0,100	5,876	6,975	68180	34,827
10	0,750	1,370	1,190	3,032	3,398	5,620	67210	30,754
11	1,580	0,860	1,350	0,100	3,695	6,685	68680	28,670
12	0,730	0,690	1,170	0,100	2,028	5,315	44650	38,629
13	1,000	1,330	0,890	0,100	3,213	5,555	51310	120,031
14	0,650	1,290	0,960	0,100	1,361	6,490	65710	103,839
15	0,930	0,350	1,060	0,100	1,787	4,870	58000	203,543
16	1,590	1,560	1,110	1,261	2,194	5,870	52080	33,820
17	0,690	1,460	1,260	0,100	2,990	5,355	50930	22,357
18	1,210	1,260	1,150	0,100	2,694	5,635	72810	61,169
19	0,940	0,730	0,620	0,100	2,805	5,520	79310	298,568
20	1,400	0,400	2,250	0,100	2,842	6,125	54720	50,996
21	0,700	0,870	1,440	1,018	5,988	7,175	44500	56,502
22	0,890	1,080	0,880	0,480	3,027	5,850	39920	74,134
23	0,880	1,230	1,290	0,842	2,361	6,475	54030	75,006
24	0,720	1,490	1,020	0,100	0,933	5,525	65510	53,762
25	0,930	1,000	1,690	0,100	3,268	6,210	69380	73,843
26	1,230	1,150	0,900	0,100	1,287	5,135	53920	43,948
27	1,510	1,290	0,960	0,100	1,991	5,175	44500	47,576
28	1,100	1,660	1,000	0,100	3,231	2,560	86090	283,985
29	1,180	0,920	1,140	0,100	1,657	4,445	43000	36,160
30	0,520	0,530	0,870	0,100	1,713	6,380	54430	49,758

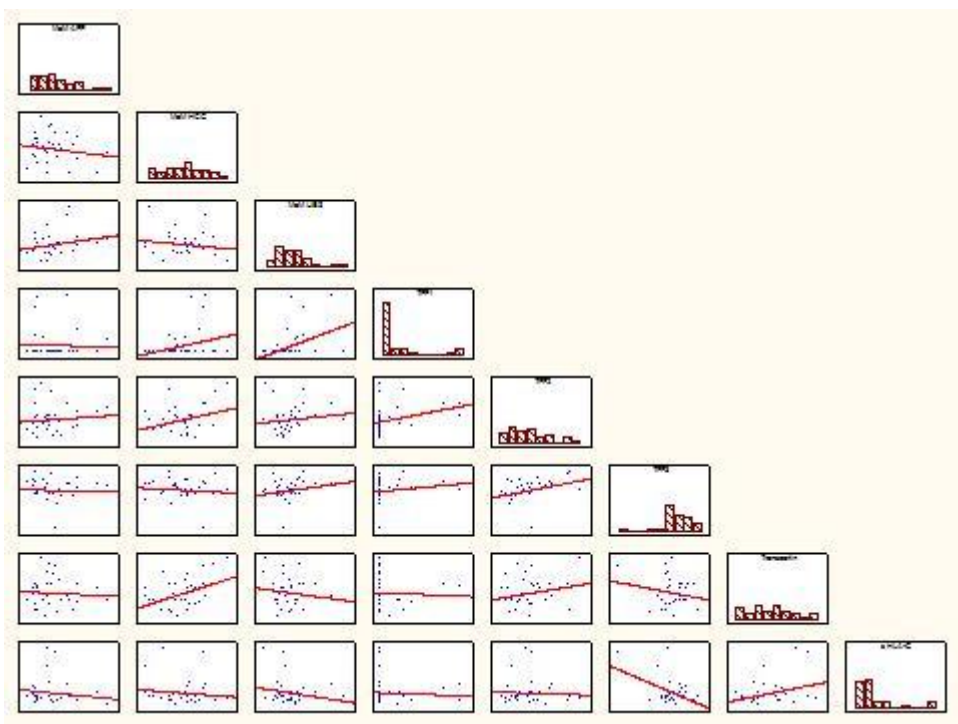
10.3.1.2.1. Exploratorní analýza dat



Graf č. 23: Ikonové grafy - mnohoúhelníky: Na ikonových grafech je vidět, že případy nejsou totožné.



Graf č. 24: Krabicový graf: Z krabicového grafu je vidět symetrické rozdělení dat.



Graf č. 25: Maticový diagram korelace znaků - Téměř na všech diagramech je viditelná téměř lineární závislost, tudíž data jsou korelovaná.

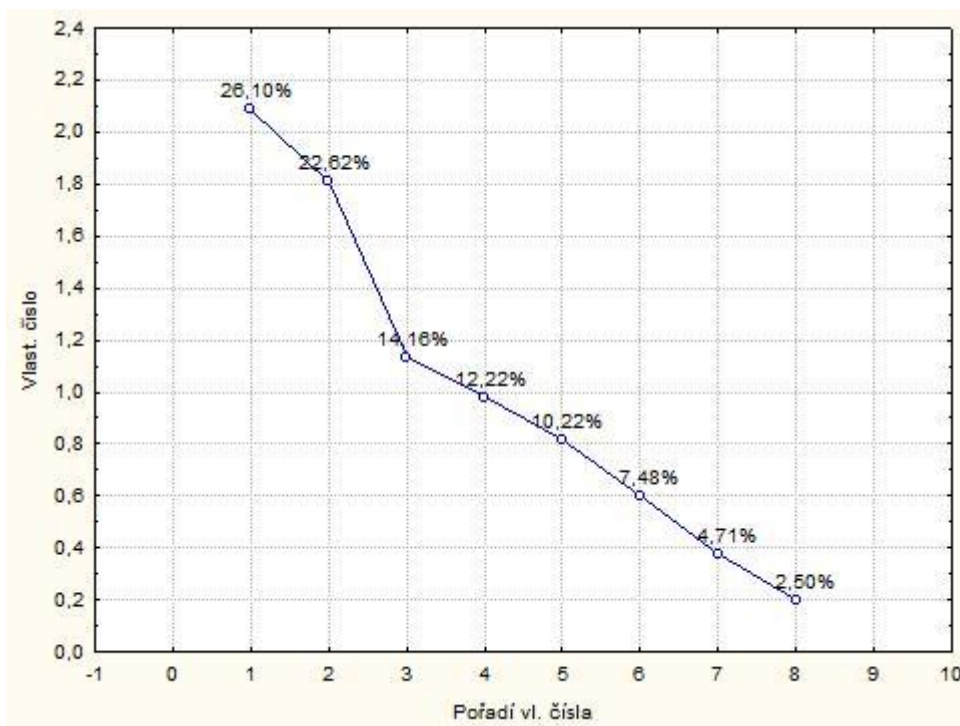
10.3.1.2.2. Analýza hlavních komponent

Tab č. 22: Korelační matice

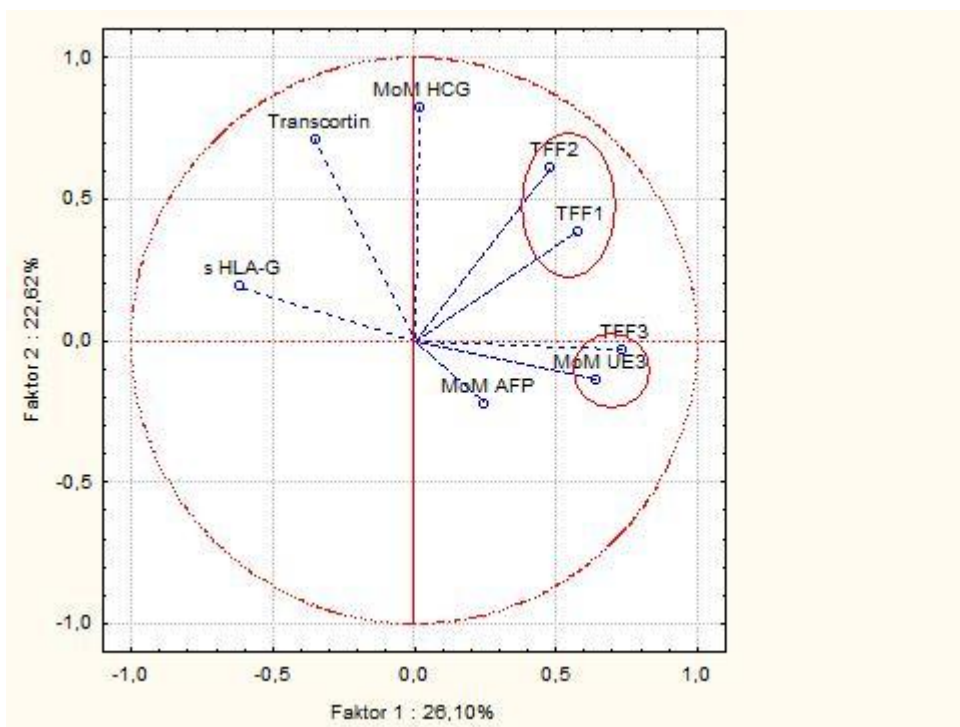
Proměnná	MoM AFP	MoM HCG	MoM UE3	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
MoM AFP	1,000000	-0,162900	0,231102	-0,016033	0,099479	-0,028246	-0,064747	-0,135885
MoM HCG	-0,162900	1,000000	-0,160843	0,277401	0,336366	-0,102314	0,440412	-0,114195
MoM UE3	0,231102	-0,160843	1,000000	0,397134	0,132060	0,239931	-0,160334	-0,197775
TFF1	-0,016033	0,277401	0,397134	1,000000	0,324863	0,211978	-0,065469	-0,060692
TFF2	0,099479	0,336366	0,132060	0,324863	1,000000	0,367713	0,219196	-0,044810
TFF3	-0,028246	-0,102314	0,239931	0,211978	0,367713	1,000000	-0,190099	-0,462751
Transcortin	-0,064747	0,440412	-0,160334	-0,065469	0,219196	-0,190099	1,000000	0,317902
s HLA-G	-0,135885	-0,114195	-0,197775	-0,060692	-0,044810	-0,462751	0,317902	1,000000

Tab č. 23: Kovariační matice

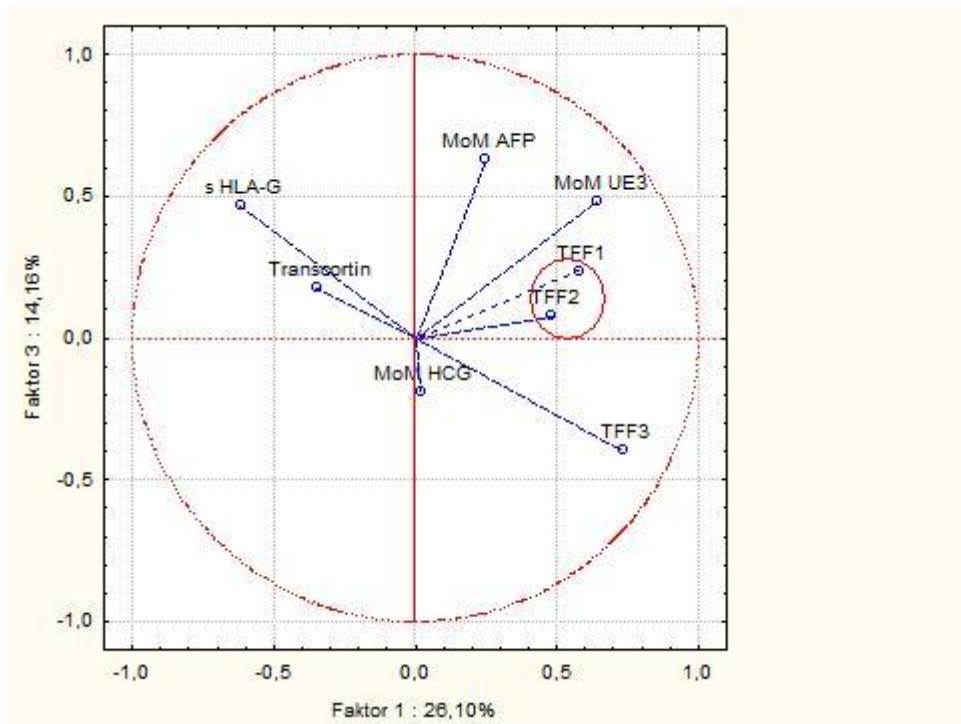
Proměnná	MoM AFP	MoM HCG	MoM UE3	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
MoM AFP	0,168	-0,032	0,034	-0,006	0,059	-0,01	-363	-3,9
MoM HCG	-0,032	0,225	-0,027	0,113	0,232	-0,04	2848	-3,8
MoM UE3	0,034	-0,027	0,125	0,121	0,068	0,07	-773	-4,9
TFF1	-0,006	0,113	0,121	0,741	0,407	0,16	-769	-3,6
TFF2	0,059	0,232	0,068	0,407	2,118	0,46	4351	-4,5
TFF3	-0,010	-0,041	0,072	0,156	0,457	0,73	-2214	-27,4
Transcortin	-362,559	2847,825	-773,324	-768,978	4351,457	-2213,84	186092513	301329,7
s HLA-G	-3,876	-3,761	-4,859	-3,631	-4,531	-27,45	301330	4828,0



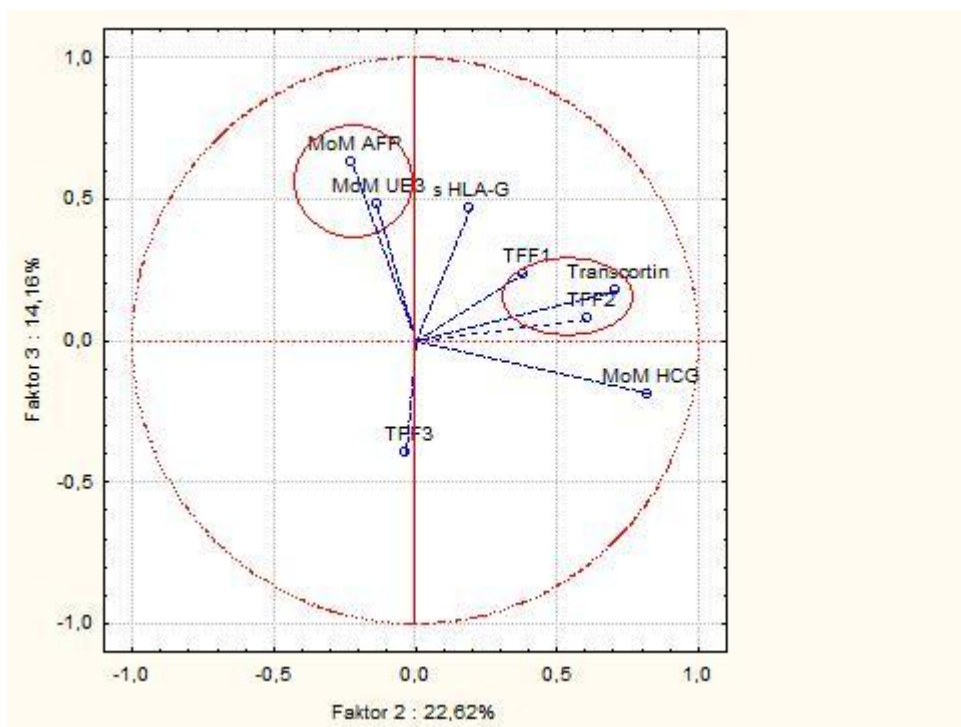
Graf č. 26: Cattelův graf vlastních čísel - Pro tento případ stačí využít čtyři proměnné, aby bylo dosaženo 75,1% statistické variability.



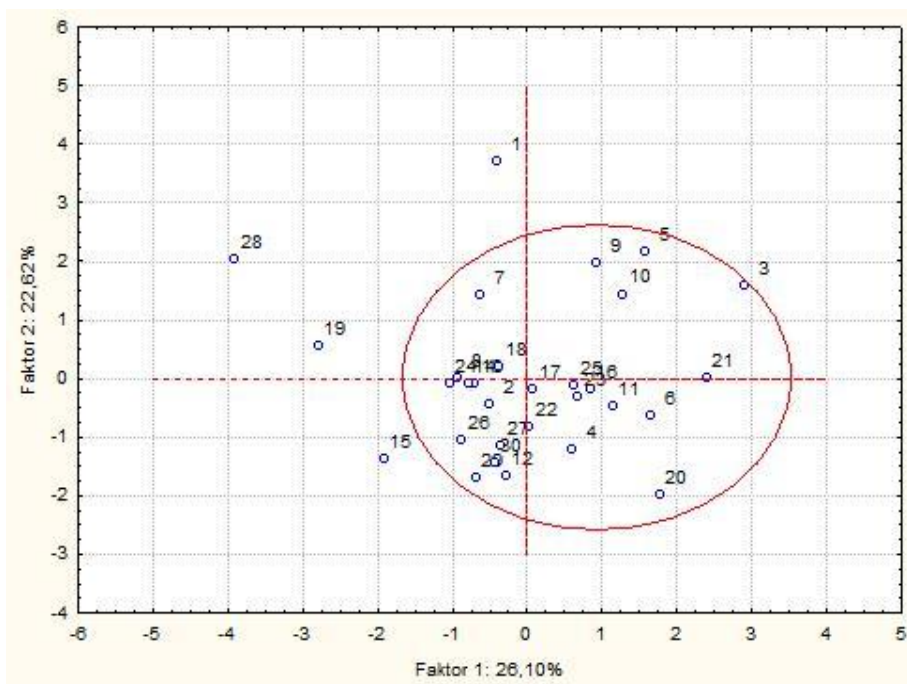
Graf č. 27: Graf komponentních vah 1 a 2 – Znaky lze rozdělit do 2 skupin. První tvoří TFF1 a TFF2. Druhou skupinu tvoří MoM UE3 a TFF3, které mají silnou korelaci.



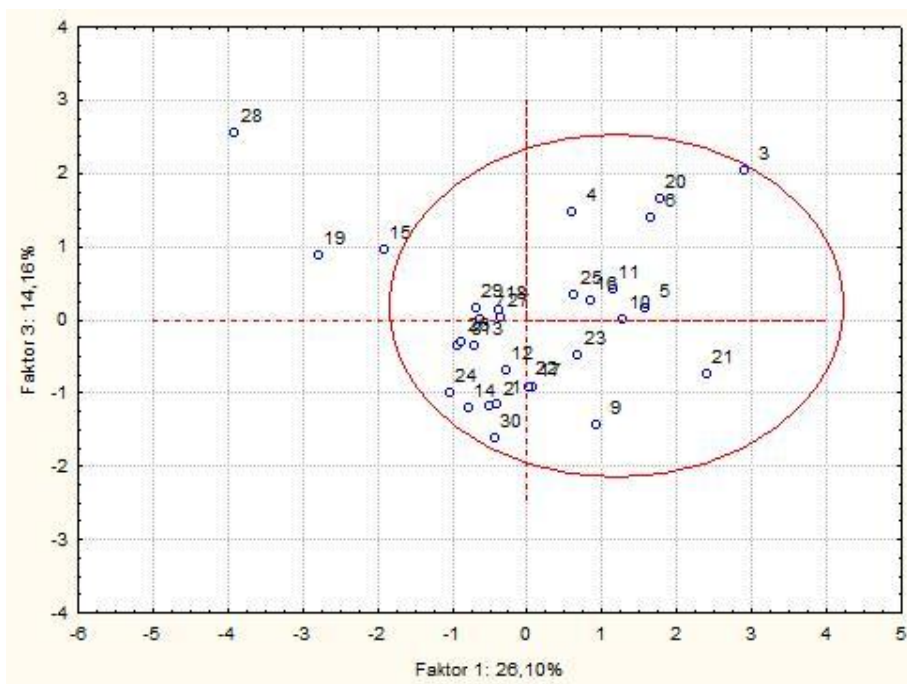
Graf č. 28: Graf komponentních vah 1 a 3 - Znaky lze rozdělit pouze do jedné skupiny, kterou tvoří TFF1 a TFF2.



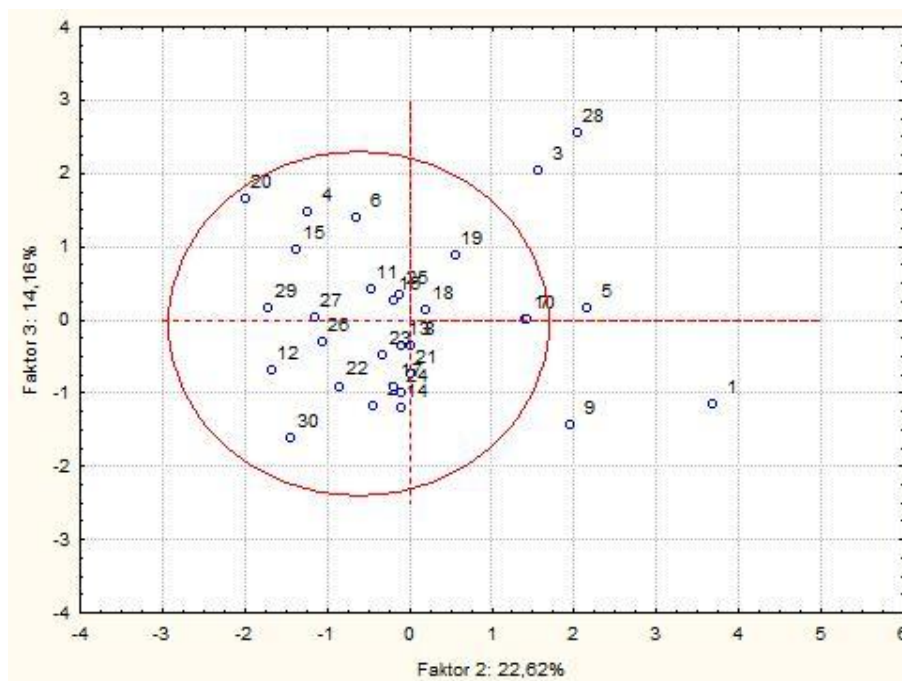
Graf č. 29: Graf komponentních vah 2 a 3 - Znaky lze rozdělit do 2 skupin. První tvoří TFF1, TFF2 a Transcortin. V této skupině mají TFF2 a transcortin vůči sobě pozitivní silnou korelaci. Druhou skupinu tvoří MoM AFP, MoM UE3, které spolu rovněž silně korelují.



Graf č. 30: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 2) - Případy tvoří jeden velký shluk, vybočující body 1, 15, 18 a 28 lze považovat za odlehlé body.



Graf č. 31: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 3) - Případy tvoří jeden velký shluk, za odlehlé body, který ve shluku neleží lze považovat 15, 19 a 28.



Graf č. 32: Rozptylový diagram komponentního skóre (2 a 3) - Případy tvoří jeden shluk, vybočující body 1, 3, 5, 9, a 28 lze považovat za odlehlé body.

10.3.1.2.3. Faktorová analýza

Tab č. 24: Průměrné hodnoty

Proměnná	Průměry	Sm.Odch.
MoM AFP	1,07	0,41
MoM HCG	1,19	0,47
MoM UE3	1,16	0,35
TFF1	0,50	0,86
TFF2	3,01	1,46
TFF3	5,73	0,85
Transcortin	61763,33	13641,57
s HLA-G	75,98	69,48

Sm. Odch. – směrodatná odchylka

Tab č. 25: Faktorové zátěže

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
MoM AFP	0,248537	-0,224740
MoM HCG	0,019620	0,822194
MoM UE3	0,645426	-0,137063
TFF1	0,579702	0,383777
TFF2	0,483585	0,611901
TFF3	0,733561	-0,034400
Transcortin	-0,347797	0,710372
s HLA-G	-0,616455	0,191245
Výkl.roz	2,087730	1,809391
Prp.celk	0,260966	0,226174

Tab č. 26: Reziduální korelace

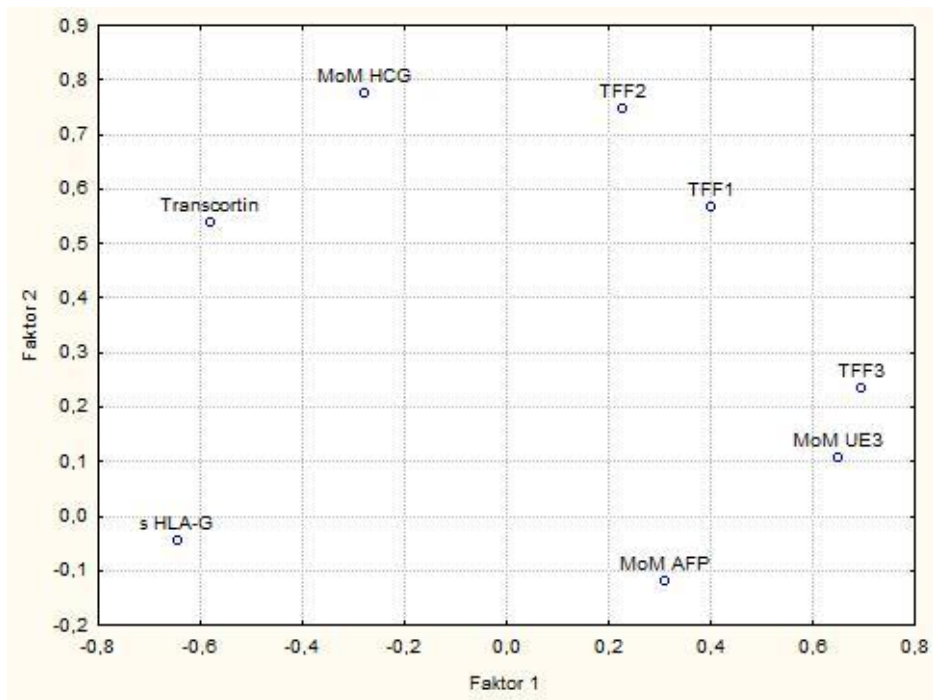
Proměnná	MoM AFP	MoM HCG	MoM UE3	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
MoM AFP	0,89	0,02	0,04	-0,07	0,12	-0,22	0,18	0,06
MoM HCG	0,02	0,32	-0,06	-0,05	-0,18	-0,09	-0,14	-0,26
MoM UE3	0,04	-0,06	0,56	0,08	-0,10	-0,24	0,16	0,23
TFF1	-0,07	-0,05	0,08	0,52	-0,19	-0,20	-0,14	0,22
TFF2	0,12	-0,18	-0,10	-0,19	0,39	0,03	-0,05	0,14
TFF3	-0,22	-0,09	-0,24	-0,20	0,03	0,46	0,09	-0,00
Transcortin	0,18	-0,14	0,16	-0,14	-0,05	0,09	0,37	-0,03
s HLA-G	0,06	-0,26	0,23	0,22	0,14	-0,00	-0,03	0,58

Tab č. 27: Koefficienty faktorového skóre

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
MoM AFP	0,155876	-0,072817
MoM HCG	-0,155383	0,427115
MoM UE3	0,315641	0,041040
TFF1	0,182303	0,298085
TFF2	0,093829	0,399019
TFF3	0,334509	0,109198
Transcortin	-0,297164	0,305914
s HLA-G	-0,313518	-0,008105

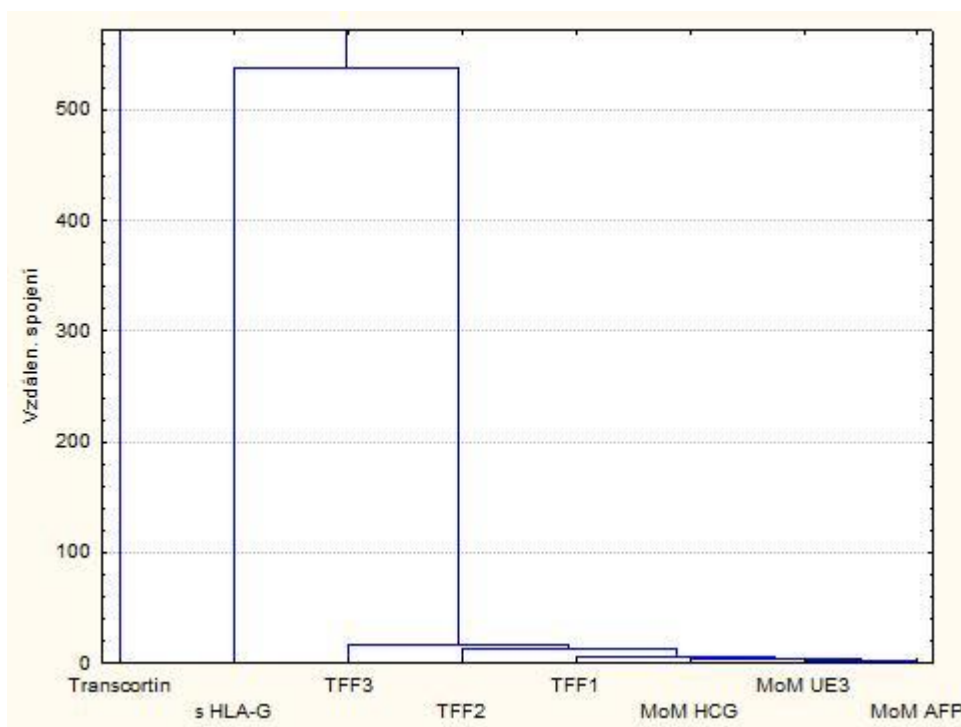
Tab č. 28: Faktorové skóre

Případ	Faktor 1	Faktor 2	15	-0,86422	-1,42572
			16	0,59307	0,08178
1	-1,24384	2,46291	17	0,09847	-0,10527
2	-0,20068	-0,42367	18	-0,29782	0,05030
3	1,44782	1,81958	19	-1,95043	-0,30709
4	0,71584	-0,69952	20	1,67975	-0,93187
5	0,43540	1,89093	21	1,54318	0,60669
6	1,24012	-0,02556	22	0,24277	-0,57518
7	-0,78066	0,82014	23	0,52312	-0,05168
8	-0,60724	-0,22696	24	-0,63955	-0,33039
9	0,06820	1,58605	25	0,44300	0,08091
10	0,44668	1,31980	26	-0,27479	-0,95273
11	0,86492	-0,03260	27	0,08910	-0,88281
12	0,27141	-1,22825	28	-3,06956	0,43855
13	-0,42775	-0,23649	29	0,02238	-1,35403
14	-0,47872	-0,26572	30	0,11003	-1,10211



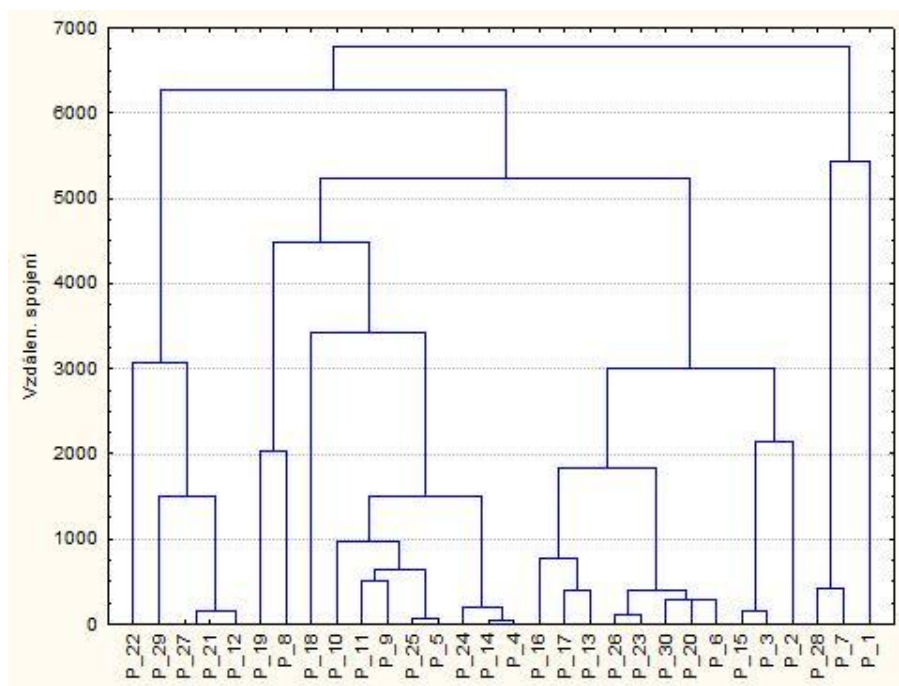
Graf č. 33: Graf faktorových vah 1, 2 - Faktor 1 ukazuje na faktorově čistý znak transcortin s kladnou hodnotou faktorové váhy. U faktoru 2 mají kladnou hodnotu faktorových vah znaky TFF2, TFF1, TFF3 a MoM UE3.

10.3.1.2.4. Analýza shluků



Graf č. 34: Třásňový graf – znaky - Nejpodobnější znaky jsou MoM UE3 a MoM AFP (skupina 1), dále se připojuje MoM HCG (skupina 2), v další rovině TFF1

(skupina 3), jako další TFF2 (skupina 4), nakonec se připojuje TFF3 (skupina 5). Na celou skupinu dále nasedá s HLA-G (skupina 5). Znak, který na ostatní navazuje jako poslední je transcortin, což znamená, že bude k ostatní v silně negativní korelaci nebo s nimi nekoreluje vůbec.



Graf č. 35: Třásňový graf – případy - Třásňový graf případů je nepřehledný. Opět dochází k rozdělení podobných případů do skupin.

10.3.1.2.5. Shrnutí statistiky

V datech byla objevena symetrie rozložení, kterou potvrzuje krabicový graf (Graf č. 24). Z maticového diagramu (Graf č. 25) je patrná lineární závislost, což svědčí o tom, že data jsou korelována.

Pro statistickou variabilitu 75,1 % stačí využít pouze první čtyři proměnné, což je vidět na Cattellově grafu (Graf č. 26).

Graf komponentních vah (Grafy č. 27, 28, 29) ukazuje opět na korelaci TFF1 a TFF2. Také se zde nachází souvislost mezi TFF3 a Mom UE3.

Z rozptylových diagramů komponentního skóre (Grafy č. 30, 31, 32) je patrné, že se v datech nacházejí odlehlé body. Za tyto body zle považovat bod 1, 15 a 28.

Analýza shluků (Graf č. 34) ukázala, že nejpodobnější znaky jsou MoM UE3 a AFP.

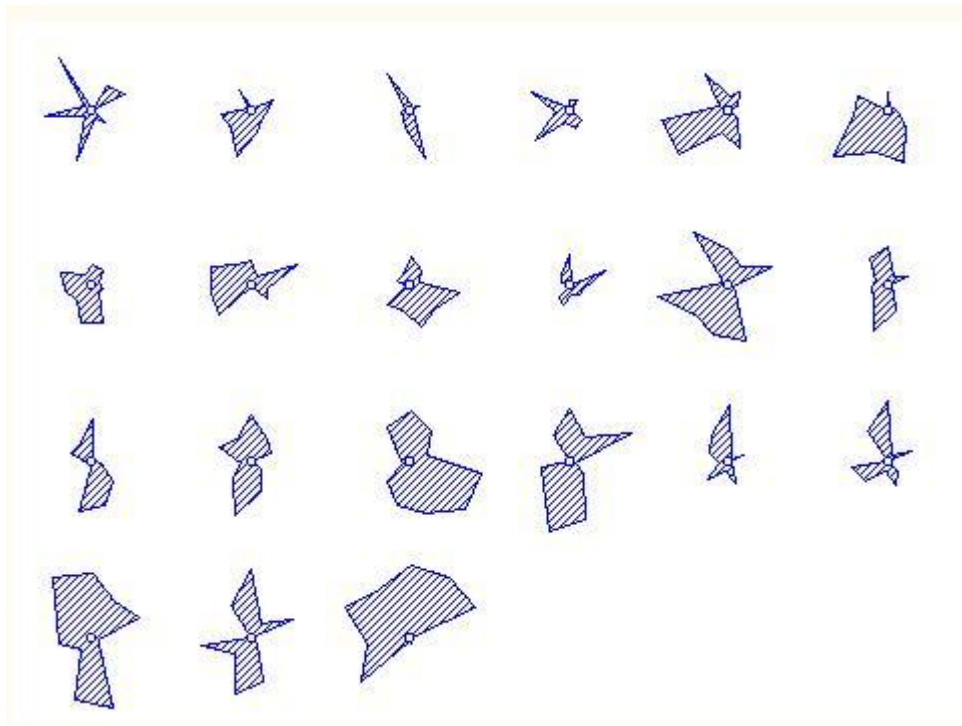
10.3.2. Druhý trimester

10.3.2.1. Data I.

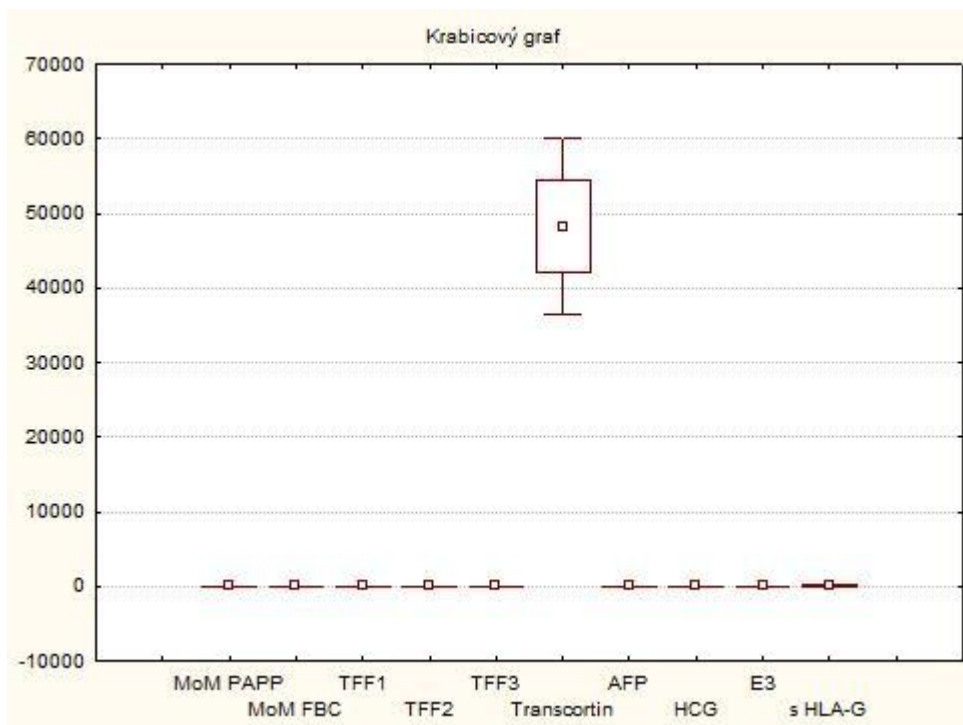
Tab č. 29: Naměřená data (Tab. byla doplněna o další data týkající se daného vzorku)

ELISA číslo	MoM PAPP	MoM FBC	TTF 1 µg/l	TTF 2 µg/l	TTF3 µg/l	Transcortin µg/l	AFP	HCG	E3	s HLA-G µg/l
1	1,500	1,460	0,115	2,805	2,400	53130	0,680	1,750	0,920	116,656
2	0,580	1,070	1,318	2,342	3,310	51750	1,050	1,330	0,840	56,047
3	0,520	0,650	0,100	1,138	4,880	43730	0,690	0,810	0,880	84,379
4	0,910	0,440	0,100	2,416	3,060	42010	1,410	0,950	1,520	21,796
5	1,240	0,700	0,100	2,009	4,215	44850	1,830	2,270	0,950	86,669
6	0,520	0,610	0,798	3,435	5,120	50290	1,940	1,430	1,350	18,344
7	1,100	0,610	1,005	1,731	4,185	49020	0,910	1,250	1,380	40,095
8	0,870	1,860	1,261	3,083	1,975	38300	1,370	1,580	1,560	59,370
9	1,160	0,660	3,868	4,662	4,330	45290	1,090	0,720	1,040	41,065
10	0,500	1,520	1,215	2,268	2,505	43680	0,790	0,570	0,950	40,581
11	1,330	1,740	0,480	1,806	5,190	52740	1,400	2,350	0,890	119,188
12	0,840	1,010	0,100	1,546	3,440	51420	0,880	0,960	1,000	69,020
13	0,440	0,410	0,722	3,992	4,565	52690	0,490	0,730	1,170	52,996
14	1,500	1,020	0,100	2,028	3,715	53750	1,000	0,830	1,380	62,662
15	1,820	0,940	5,661	9,36	5,050	50990	1,100	0,780	0,980	83,662
16	1,540	2,360	0,500	2,768	5,350	58430	1,170	1,260	0,800	67,844
17	0,610	0,860	0,100	1,491	3,230	41210	1,040	0,810	1,130	68,579
18	0,750	1,140	0,100	2,250	3,375	40750	1,060	1,490	0,780	76,167
19	2,010	1,840	0,573	1,843	6,065	56630	0,820	1,400	1,470	130,443
20	1,080	1,700	0,100	1,491	4,510	54540	0,950	1,860	0,790	77,904
21	3,100	2,450	0,100	0,635	2,300	38520	1,830	1,680	2,020	107,224

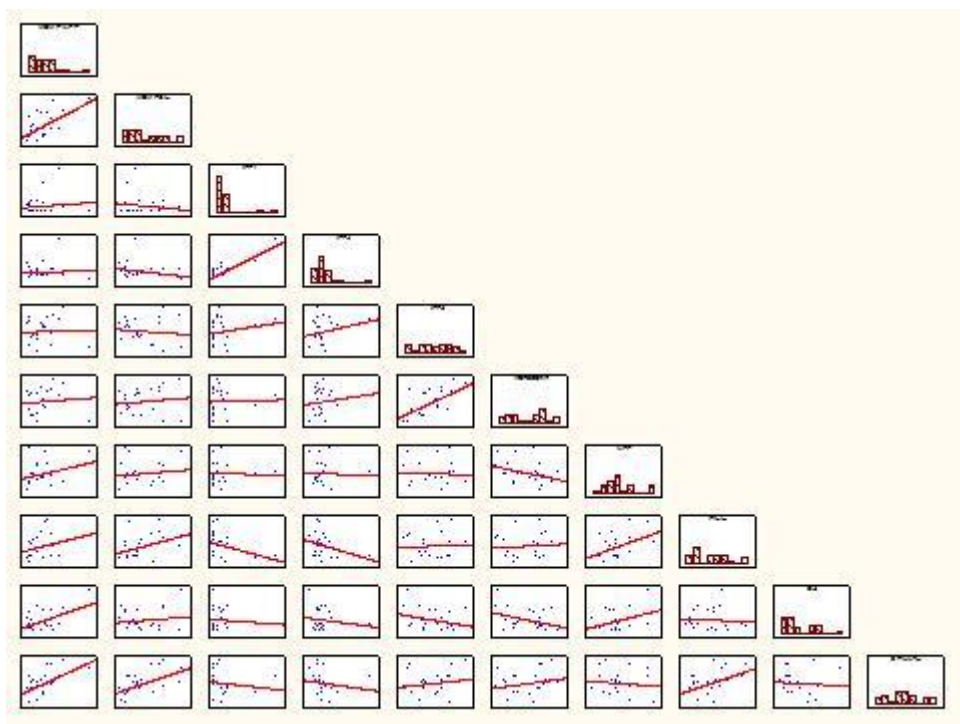
10.3.2.1.1. Exploratorní analýza dat



Graf č. 36: Ikonové grafy - mnohoúhelníky: Na ikonových grafech je vidět, že případy nejsou totožné.



Graf č. 37: Krabicový graf - Z krabicového grafu je vidět symetrické rozdělení dat.



Graf č. 38: Maticový diagram korelace znaků - Téměř na všech diagramech je viditelná téměř lineární závislost, tudíž data jsou korelovaná.

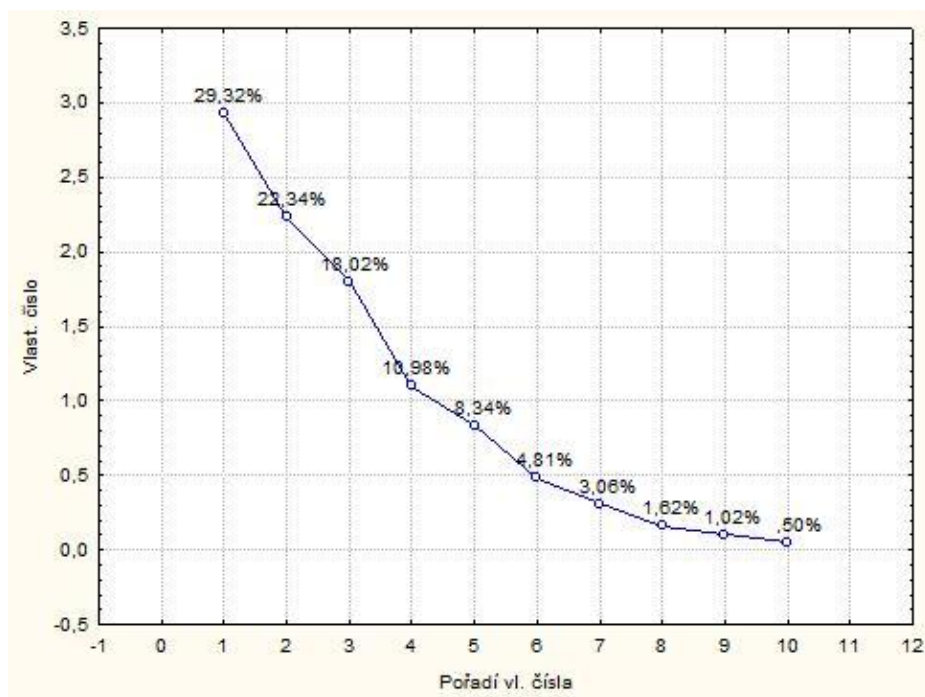
10.3.2.1.2. Analýza hlavních komponent

Tab č. 29: Korelační matice

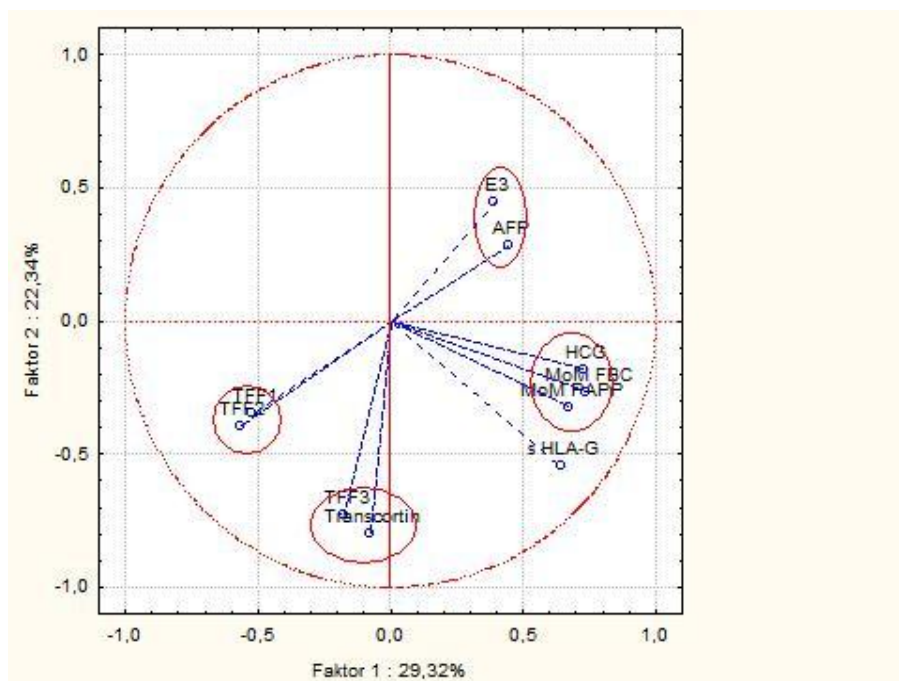
Proměnná	MoM PAPP	MoM FBC	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	AFP	HCG	E3	s HLA-G
MoM PAPP	1,000000	0,607087	0,107292	0,029369	0,037549	0,091994	0,307119	0,316880	0,480839	0,598600
MoM FBC	0,607087	1,000000	-0,168066	-0,245790	-0,113443	0,124410	0,145042	0,416330	0,142418	0,552852
TFF1	0,107292	-0,168066	1,000000	0,892374	0,203019	0,035576	-0,037143	-0,352294	-0,103900	-0,153031
TFF2	0,029369	-0,245790	0,892374	1,000000	0,238685	0,154728	-0,046394	-0,315956	-0,157456	-0,158463
TFF3	0,037549	-0,113443	0,203019	0,238685	1,000000	0,633079	-0,057743	0,048332	-0,276949	0,166381
Transcortin	0,091994	0,124410	0,035576	0,154728	0,633079	1,000000	-0,337456	0,084703	-0,360280	0,223226
AFP	0,307119	0,145042	-0,037143	-0,046394	-0,057743	-0,337456	1,000000	0,504345	0,395800	-0,101208
HCG	0,316880	0,416330	-0,352294	-0,315956	0,048332	0,084703	0,504345	1,000000	-0,033439	0,516404
E3	0,480839	0,142418	-0,103900	-0,157456	-0,276949	-0,360280	0,395800	-0,033439	1,000000	-0,067229
s HLA-G	0,598600	0,552852	-0,153031	-0,158463	0,166381	0,223226	-0,101208	0,516404	-0,067229	1,000000

Tab č. 30: Kovariační matice

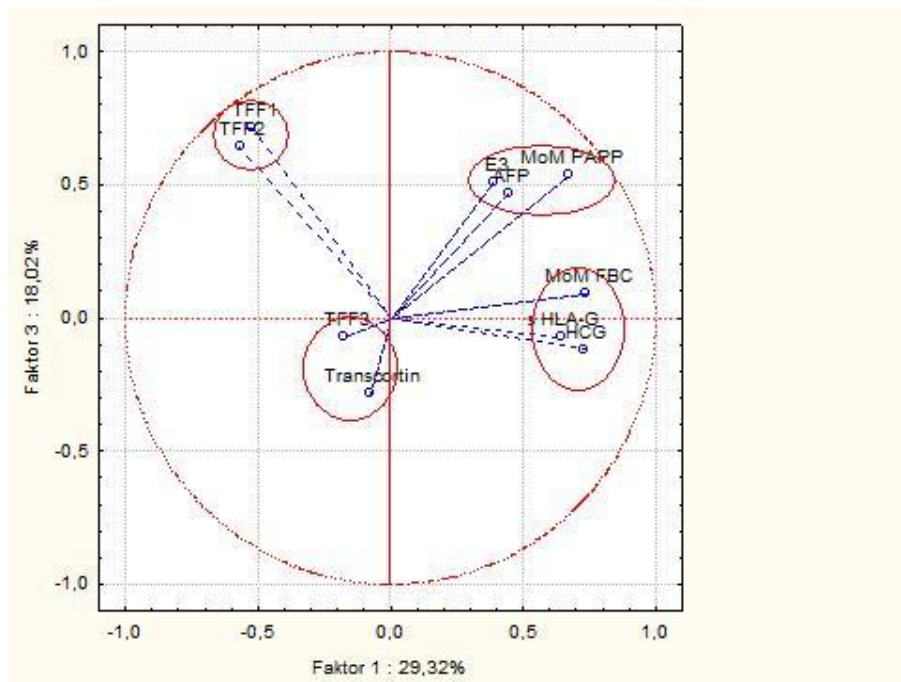
Proměnná	MoM PAPP	MoM FBC	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	AFP	HCG	E3	s HLA-G
MoM PAPP	0,4081	0,2372	0,0954	0,034	0,027	358	0,077	0,1036	0,100	11,68
MoM FBC	0,2372	0,3739	-0,1430	-0,272	-0,079	463	0,035	0,1303	0,028	10,32
TFF1	0,0954	-0,1430	1,9371	2,246	0,321	302	-0,020	-0,2510	-0,047	-6,50
TFF2	0,0339	-0,2718	2,2462	3,271	0,491	1704	-0,033	-0,2926	-0,093	-8,75
TFF3	0,0273	-0,0789	0,3213	0,491	1,293	4384	-0,026	0,0281	-0,103	5,78
Transcortin	357,9624	463,3529	301,5891	1704,380	4384,189	37098549	-801,813	264,1433	-715,638	41517,73
AFP	0,0765	0,0346	-0,0202	-0,033	-0,026	-802	0,152	0,1007	0,050	-1,21
HCG	0,1036	0,1303	-0,2510	-0,293	0,028	264	0,101	0,2621	-0,006	8,07
E3	0,1002	0,0284	-0,0472	-0,093	-0,103	-716	0,050	-0,0056	0,106	-0,67
s HLA-G	11,6774	10,3228	-6,5038	-8,751	5,777	41518	-1,206	8,0735	-0,669	932,44



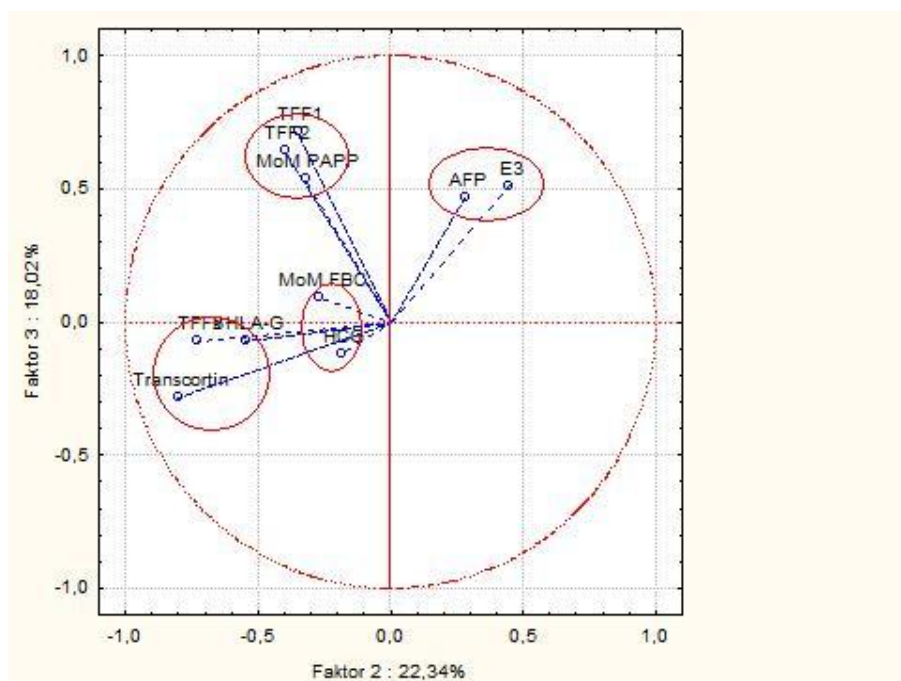
Graf č. 39: Cattelův graf vlastních čísel - Pro tento případ stačí využít čtyři proměnné, aby bylo dosaženo 80,66% statistické variability.



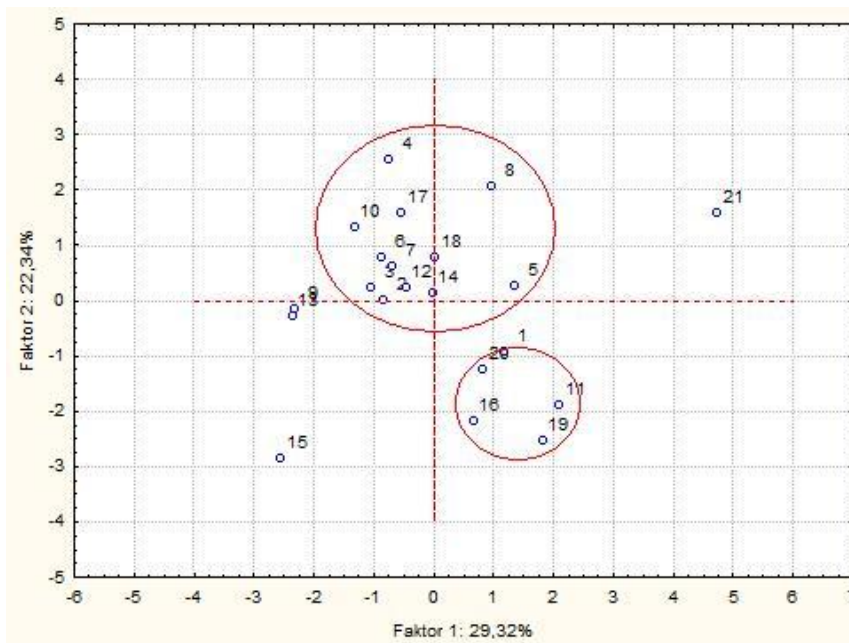
Graf č. 40: Graf komponentních vah 1 a 2 – Znaky lze rozdělit do 4 skupin. První tvoří TFF1 a TFF2, druhou TFF3 a Transcortin. Třetí skupinu znaků tvoří E3 a AFP a poslední HCG, MoM FBC a MoM PAPP. Ve všech skupinách znaků je silně pozitivní korelace. Samostatný znak, který nepatří ani do jedné skupiny je s HLA-G.



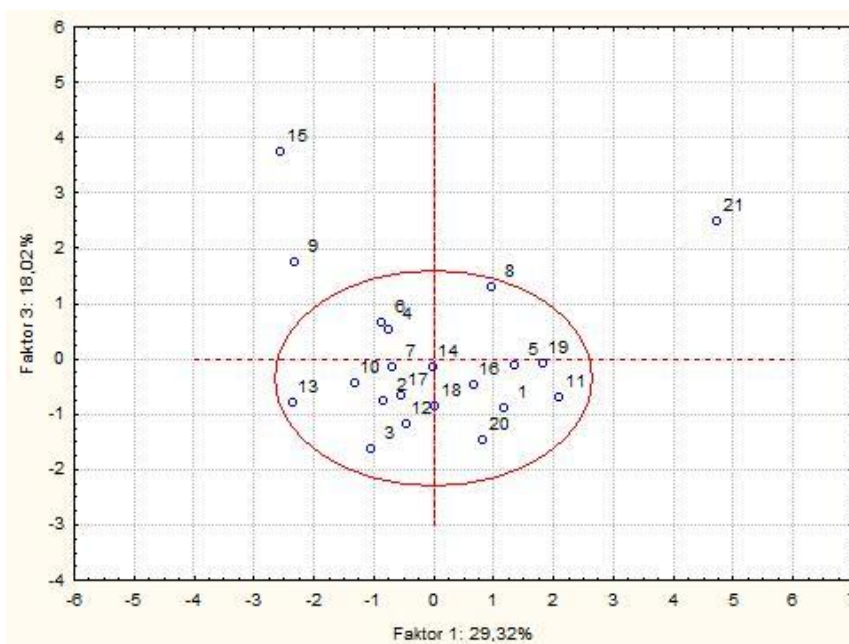
Graf č. 41: Graf komponentních vah 1 a 3 – Znaky lze rozdělit opět do 4 skupin. První tvoří TFF1 a TFF2, druhou skupinu znaků tvoří E3, AFP a MoM PAPP. Další skupina je MoM FBC, s HLA-G a HCG. Ve všech skupinách znaků je silně pozitivní korelace. Poslední skupinu tvoří TFF3 a transcortin.



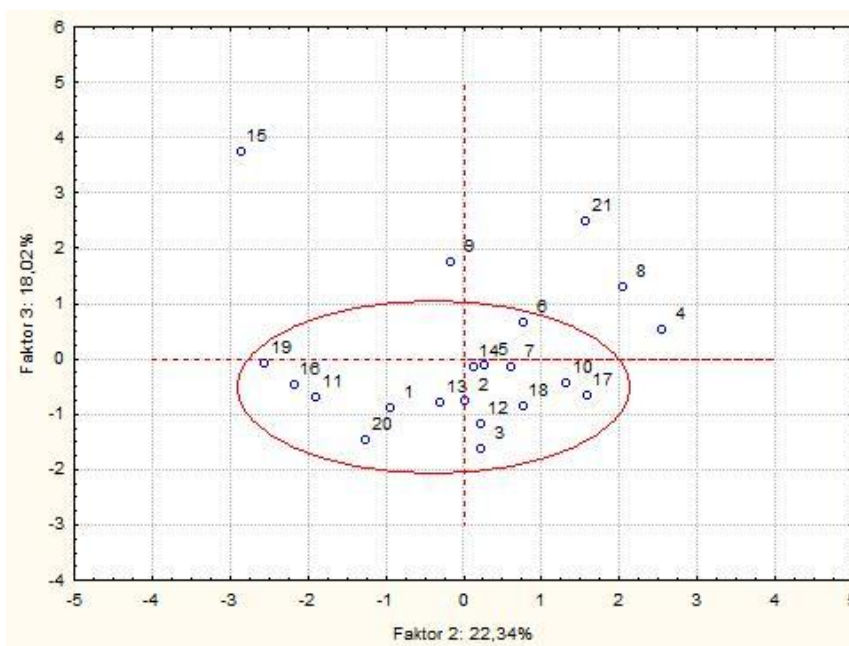
Graf č. 42: Graf komponentních vah 2 a 3 - Znaky lze rozdělit do 4 skupin. První skupinu tvoří znaky E3 a AFP. Druhou skupinu tvoří TFF1, TFF2 a MoM PAPP. Do třetí skupiny patří MoM FBC a HCG. Poslední skupina je TFF3, s HLA-G a Transcortin.



Graf č. 43: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 2) - Případy tvoří dva shluk, vybočující body 9, 13, 15 a 21 lze považovat za odlehlé body.



Graf č. 44: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 3) - Případy tvoří jeden velký shluk, za odlehlé body, který ve shluku neleží lze považovat 9, 15 a 21.



Graf č. 45: Rozptylový diagram komponentního skóre (2 a 3) - Případy tvoří jeden shluk, vybočující body 4, 8, 9, 15 a 21 lze považovat za odlehlé body.

10.3.2.1.3. Faktorová analýza

Tab č. 31: Průměrné hodnoty

Proměnná	Průměry	Sm.Odch.
MoM PAPP	1,14	0,639
MoM FBC	1,19	0,611
TFF1	0,88	1,392
TFF2	2,62	1,809
TFF3	3,94	1,137
Transcortin	48272,38	6090,858
AFP	1,12	0,390
HCG	1,28	0,512
E3	1,13	0,326
s HLA-G	70,51	30,536

Sm. Odch. – Směrodatná odchylka

Tab č. 32: Faktorové zátěže

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
MoM PAPP	0,674422	-0,321396
MoM FBC	0,738770	-0,267301
TFF1	-0,523142	-0,348496
TFF2	-0,568302	-0,398191
TFF3	-0,176678	-0,725185
Transcortin	-0,077514	-0,801696
AFP	0,442722	0,281281
HCG	0,730973	-0,180924
E3	0,392242	0,445948
s HLA-G	0,642818	-0,547339
Výkl.roz	2,931889	2,233662
Prp.celk	0,293189	0,223366

Tab č. 33: Reziduální korelace

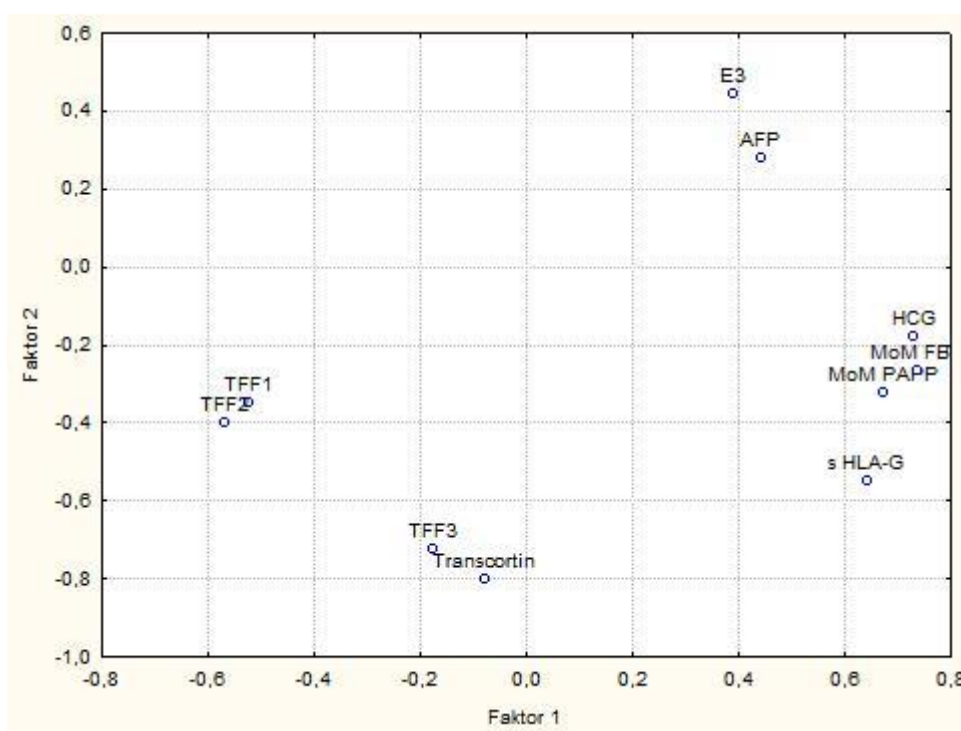
Proměnná	MoM PAPP	MoM FBC	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	AFP	HCG	E3	s HLA-G
MoM PAPP	0,44	0,02	0,35	0,28	-0,08	-0,11	0,10	-0,23	0,36	-0,01
MoM FBC	0,02	0,38	0,13	0,07	-0,18	-0,03	-0,11	-0,17	-0,03	-0,07
TFF1	0,35	0,13	0,60	0,46	-0,14	-0,28	0,29	-0,03	0,26	-0,01
TFF2	0,28	0,07	0,46	0,52	-0,15	-0,21	0,32	0,03	0,24	-0,01
TFF3	-0,08	-0,18	-0,14	-0,15	0,44	0,04	0,22	0,05	0,12	-0,12
Transcortin	-0,11	-0,03	-0,28	-0,21	0,04	0,35	-0,08	-0,00	0,03	-0,17
AFP	0,10	-0,11	0,29	0,32	0,22	-0,08	0,72	0,23	0,10	-0,23
HCG	-0,23	-0,17	-0,03	0,03	0,05	-0,00	0,23	0,43	-0,24	-0,05
E3	0,36	-0,03	0,26	0,24	0,12	0,03	0,10	-0,24	0,65	-0,08
s HLA-G	-0,01	-0,07	-0,01	-0,01	-0,12	-0,17	-0,23	-0,05	-0,08	0,29

Tab č. 34: Koefficienty faktorového skóre

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
MoM PAPP	0,230030	-0,143888
MoM FBC	0,251978	-0,119669
TFF1	-0,178432	-0,156020
TFF2	-0,193835	-0,178268
TFF3	-0,060261	-0,324662
Transcortin	-0,026438	-0,358915
AFP	0,151002	0,125928
HCG	0,249318	-0,080999
E3	0,133785	0,199649
s HLA-G	0,219250	-0,245041

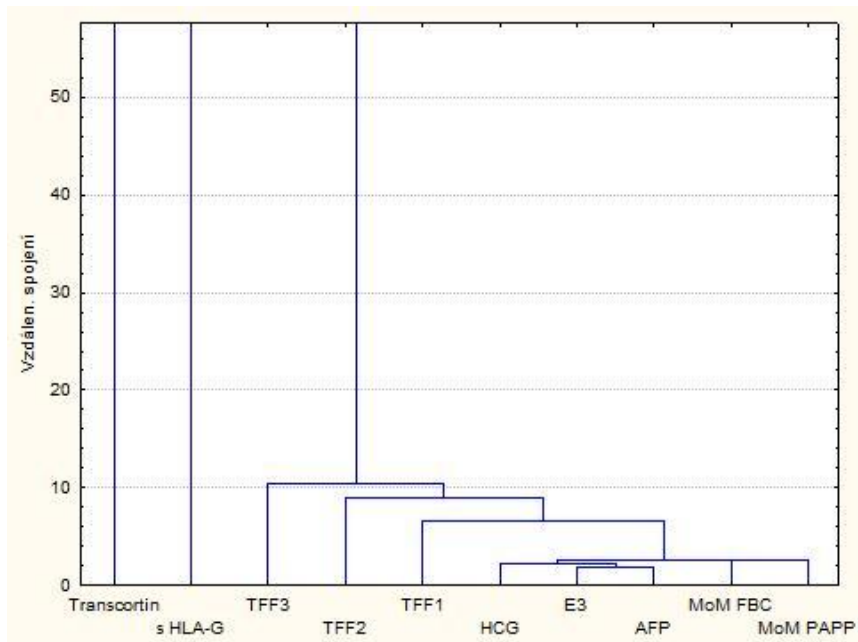
Tab č. 35: Faktorové skóre

Případ	Faktor 1	Faktor 2
11	1,22831	-1,26348
12	-0,26712	0,15743
13	-1,37372	-0,19881
14	-0,00832	0,08645
15	-1,48257	-1,90786
16	0,39518	-1,45505
17	-0,31135	1,06412
18	0,01718	0,51240
19	1,06684	-1,70154
20	0,48227	-0,83527
21	2,76518	1,05270

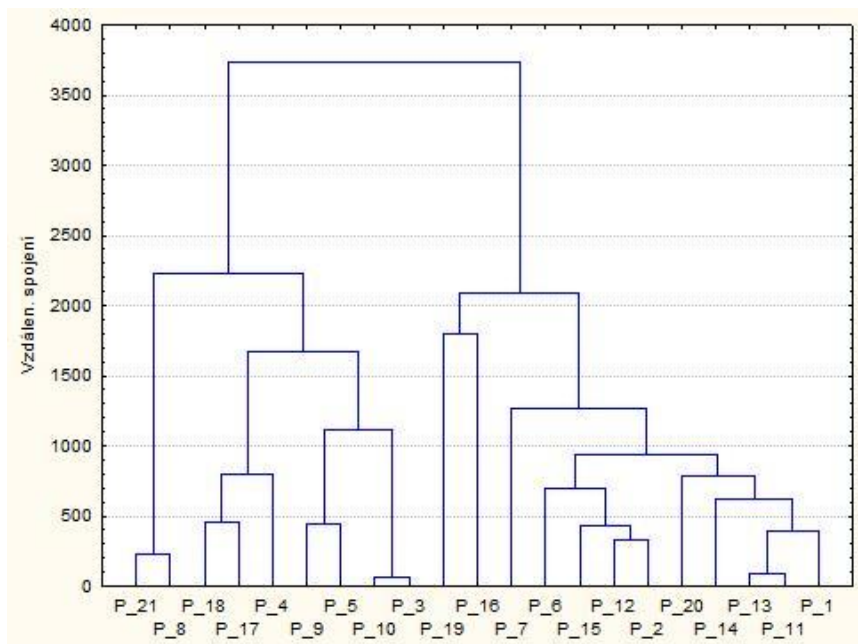


Graf č. 46: Graf faktorových vah 1,2 - Faktor 2 ukazuje na faktorově čisté znaky E3 a AFP, s kladnou hodnotou faktorové váhy. Zápornou hodnotu faktorových vah mají transcortin a TFF3, což znamená, že hodnota znaků roste s klesající hodnotou faktoru 2. Faktor 1 ukazuje na zápornou hodnotu faktorových vah pro HCG, MoM FBC, MoM PAPP a HLA-G.

10.3.2.1.4. Analýza shluků



Graf č. 47: Třásňový graf – znaky - Nejpodobnější znaky jsou E3 a FAP (skupina 1), dále se připojuje HCG (skupina 2), na celou skupinu se napojují MoM FCB a MoM PAPP (skupina 3), v další rovině se napojuje TFF1 (skupina 4), jako další TFF2 (skupina 5), jako další TFF3 (skupina 6). Na celou skupinu dále nasedá s HLA-G (skupina 7). Znak, který na ostatní navazuje jako poslední je transcortin, což naznačuje, že se od ostatních nejvíce liší.



Graf č. 48: Třásňový graf – případy - Třásňový graf případů je nepřehledný. Opět dochází k rozdělení podobných případů do skupin.

10.3.2.1.5. Shrnutí statistiky

Z krabicového grafu (Graf č. 37) je opět viditelné symetrické rozložení dat. Data jsou rovněž v lineárním rozložení, a tudíž jsou korelována, což naznačuje Maticový diagram (Graf č. 38).

Ze sutinového grafu (Graf č. 39) je patrné, že pro statistickou variabilitu stačí pouze první čtyři proměnné a stejně bude variabilita 80,66 %.

Grafy komponentních vah (Grafy č. 40, 41, 42) naznačily, že existuje korelace mezi TFF1 a TFF2, rovněž mezi TFF3 a transkortinem. Rovněž je zde podobnost mezi E3 a AFP. Poslední shluk tvoří FBC, PAPP a HCG. Z daných skupin mají pouze TFF1 a TFF2.

Rozptylové diagramy komponentního skóre (Grafy č. 43, 44, 45) ukazují na tři odlehlé body, kterými jsou 6, 15 a 21.

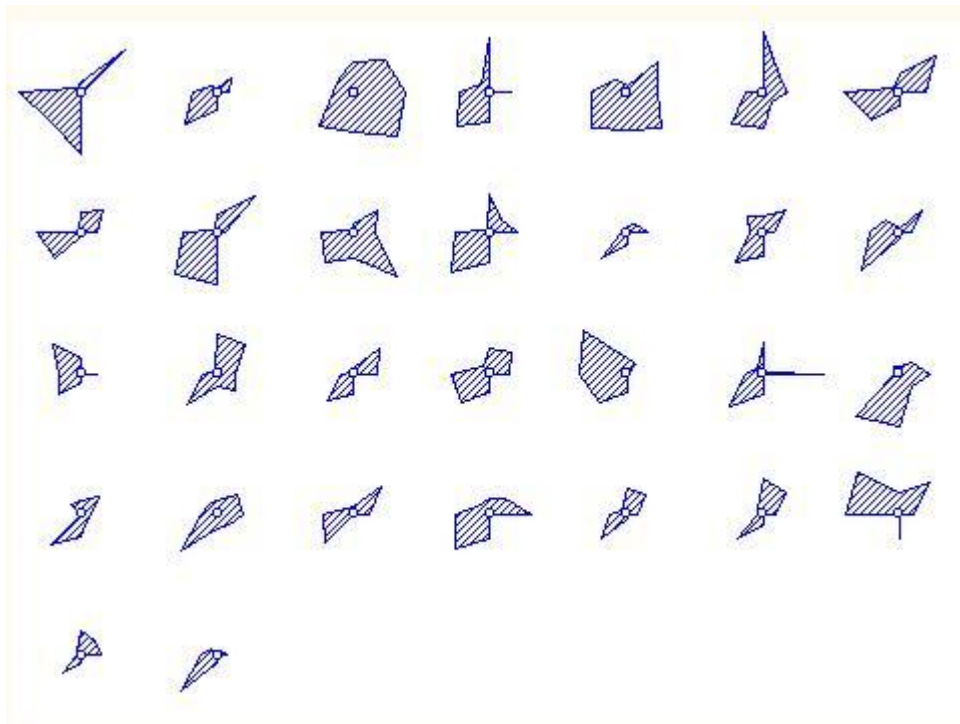
Shluková analýza (Graf č. 47) prokázala, že nejpohodnější si jsou E3 a AFP. Všechny tři TFF opět leží na jedné větvi a připojují se na sebe.

10.3.2.2. Data II.

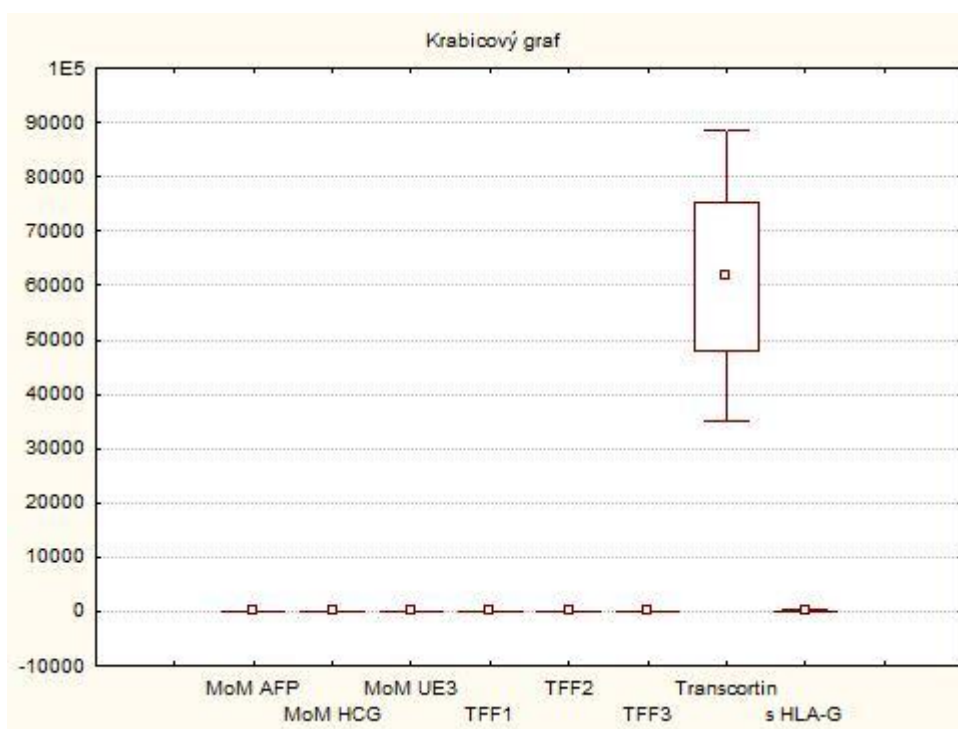
Tab. č. 36: Naměřená data (Tab. byla doplněna o další data týkající se daného vzorku)

ELISA číslo	MoM AFP	MoM HCG	MoM UE3	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	S HLA-G
				µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
1	0,800	2,200	0,660	0,100	6,759	5,675	91880	40,581
2	0,640	0,960	0,940	0,100	2,527	6,000	60270	61,767
3	1,360	1,700	2,010	3,062	4,662	6,180	58120	110,464
4	2,030	0,350	1,170	0,100	3,825	6,130	65710	69,020
5	0,680	1,680	1,440	2,494	4,550	6,250	69310	90,093
6	2,230	1,030	1,260	0,753	4,233	5,990	55000	14,082
7	1,010	1,890	1,340	0,100	2,213	5,395	86450	49,602
8	1,080	1,310	1,030	0,100	1,249	5,320	77290	21,796
9	1,050	1,930	0,810	0,100	5,876	6,975	68180	34,827
10	0,750	1,370	1,190	3,032	3,398	5,620	67210	30,754
11	1,580	0,860	1,350	0,100	3,695	6,685	68680	28,670
12	0,730	0,690	1,170	0,100	2,028	5,315	44650	38,629
13	1,000	1,330	0,890	0,100	3,213	5,555	51310	120,031
14	0,650	1,290	0,960	0,100	1,361	6,490	65710	103,839
15	0,930	0,350	1,060	0,100	1,787	4,870	58000	203,543
16	1,590	1,560	1,110	1,261	2,194	5,870	52080	33,820
17	0,690	1,460	1,260	0,100	2,990	5,355	50930	22,357
18	1,210	1,260	1,150	0,100	2,694	5,635	72810	61,169
19	0,940	0,730	0,620	0,100	2,805	5,520	79310	298,568
20	1,400	0,400	2,250	0,100	2,842	6,125	54720	50,996
21	0,700	0,870	1,440	1,018	5,988	7,175	44500	56,502
22	0,890	1,080	0,880	0,480	3,027	5,850	39920	74,134
23	0,880	1,230	1,290	0,842	2,361	6,475	54030	75,006
24	0,720	1,490	1,020	0,100	0,933	5,525	65510	53,762
25	0,930	1,000	1,690	0,100	3,268	6,210	69380	73,843
26	1,230	1,150	0,900	0,100	1,287	5,135	53920	43,948
27	1,510	1,290	0,960	0,100	1,991	5,175	44500	47,576
28	1,100	1,660	1,000	0,100	3,231	2,560	86090	283,985
29	1,180	0,920	1,140	0,100	1,657	4,445	43000	36,160
30	0,520	0,530	0,870	0,100	1,713	6,380	54430	49,758

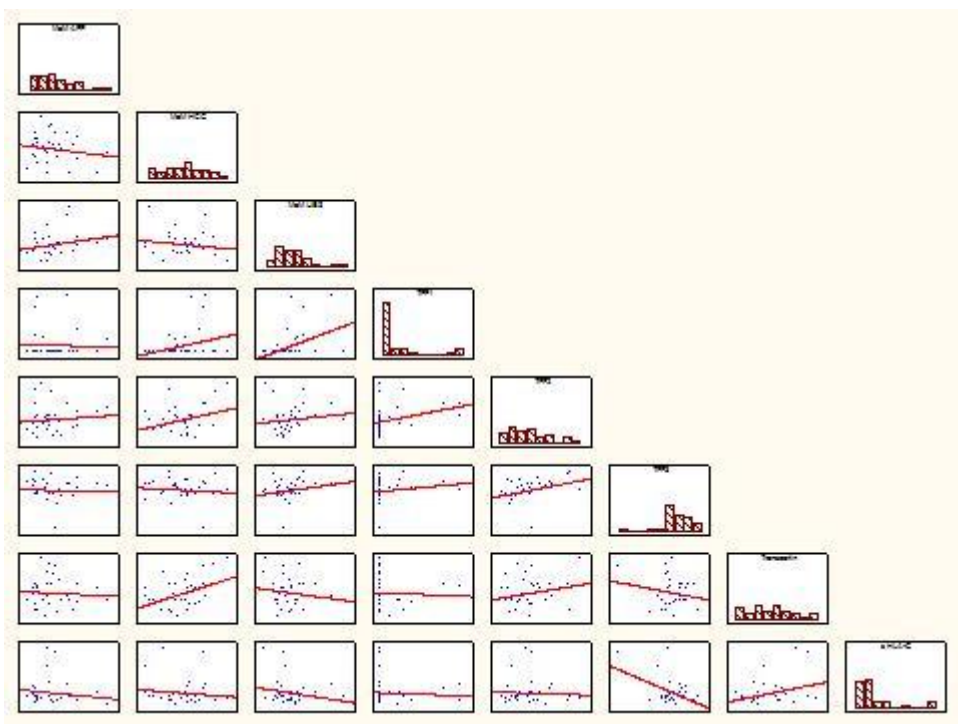
10.3.2.2.1. Exploratorní analýza dat



Graf č. 49: Ikonové grafy - mnohoúhelníky: Na ikonových grafech je vidět, že případy nejsou totožné.



Graf č. 50: Krabicový graf - Z krabicového grafu je vidět symetrické rozdělení dat.



Graf č. 51: Maticový diagram korelace znaků - Téměř na všech diagramech je viditelná téměř lineární závislost, tudíž data jsou korelovaná.

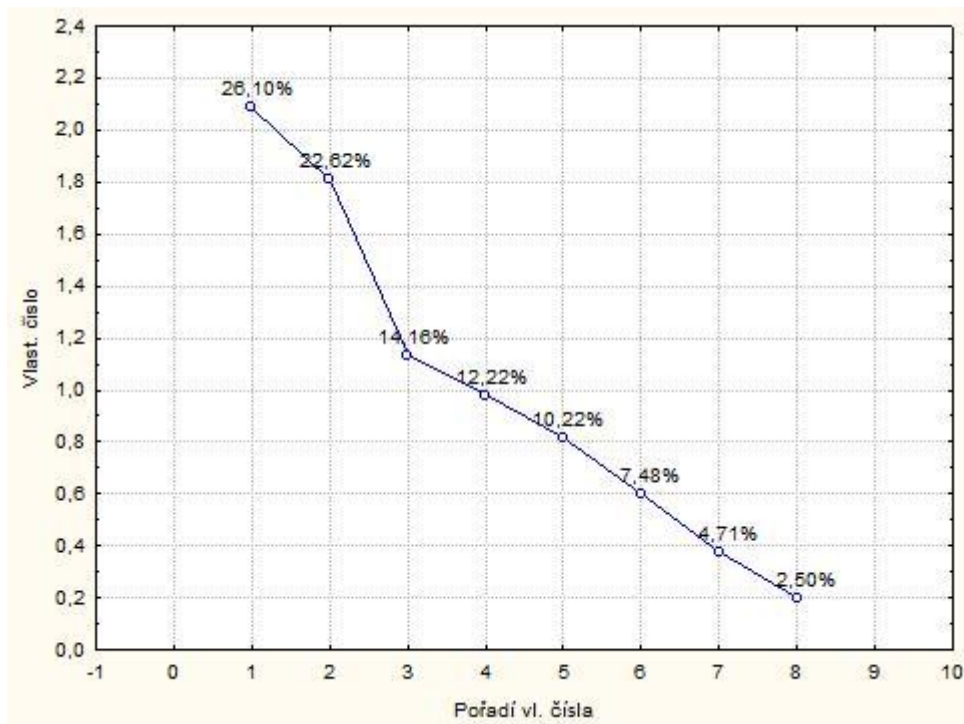
10.3.2.2.2. Analýza hlavních komponent

Tab č. 36: Korelační matice

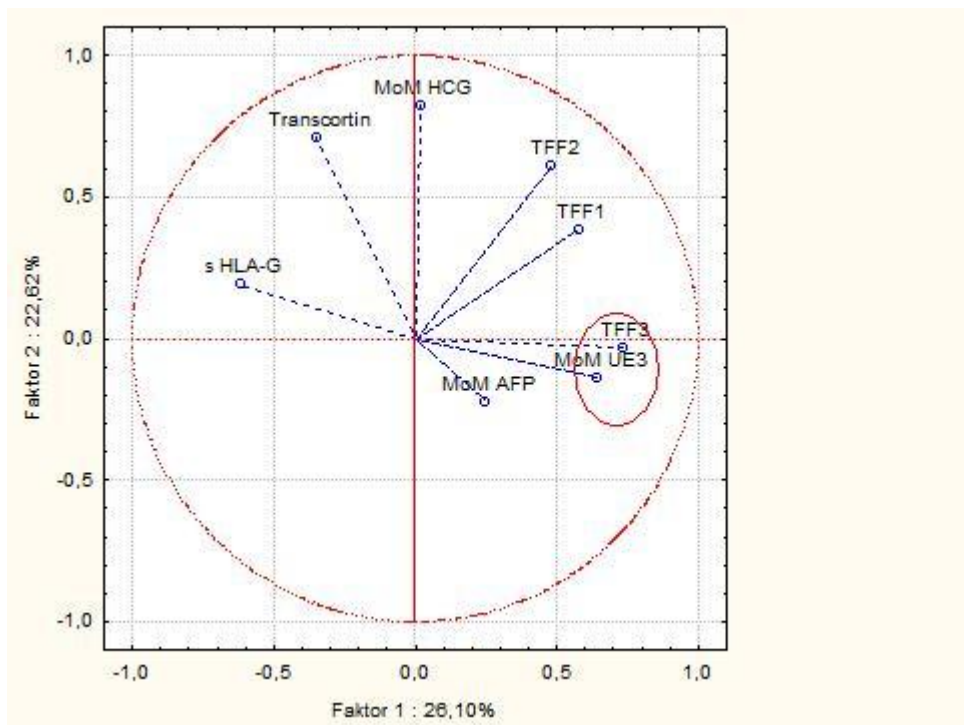
Proměnná	MoM AFP	MoM HCG	MoM UE3	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
MoM AFP	1,000000	-0,162900	0,231102	-0,016033	0,099479	-0,028246	-0,064747	-0,135885
MoM HCG	-0,162900	1,000000	-0,160843	0,277401	0,336366	-0,102314	0,440412	-0,114195
MoM UE3	0,231102	-0,160843	1,000000	0,397134	0,132060	0,239931	-0,160334	-0,197775
TFF1	-0,016033	0,277401	0,397134	1,000000	0,324863	0,211978	-0,065469	-0,060692
TFF2	0,099479	0,336366	0,132060	0,324863	1,000000	0,367713	0,219196	-0,044810
TFF3	-0,028246	-0,102314	0,239931	0,211978	0,367713	1,000000	-0,190099	-0,462751
Transcortin	-0,064747	0,440412	-0,160334	-0,065469	0,219196	-0,190099	1,000000	0,317902
s HLA-G	-0,135885	-0,114195	-0,197775	-0,060692	-0,044810	-0,462751	0,317902	1,000000

Tab č. 37: Kovariační matice

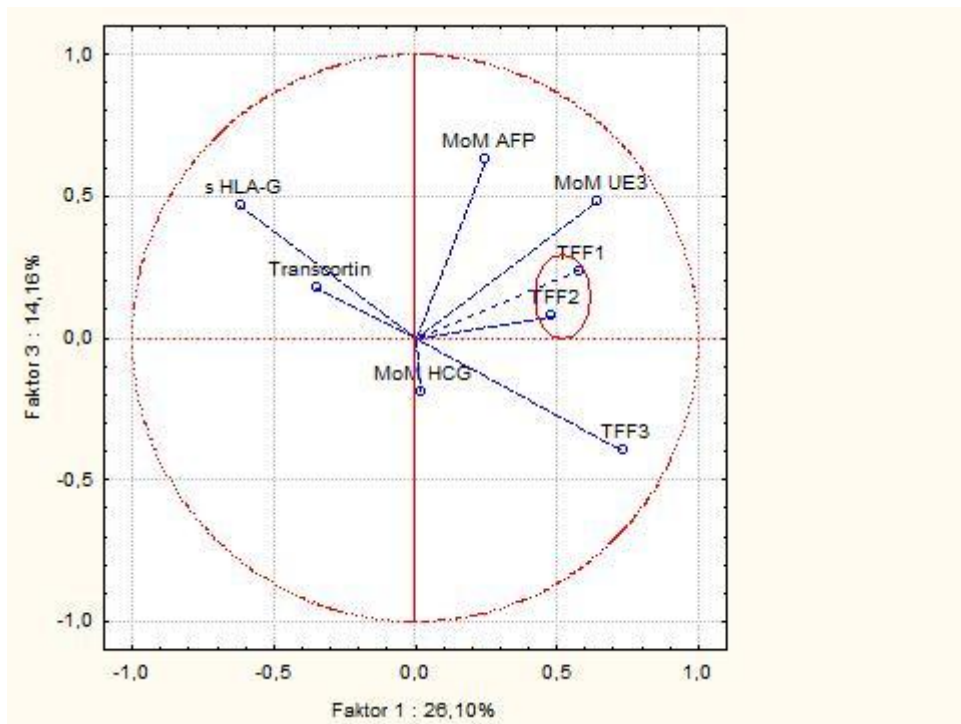
Proměnná	MoM AFP	MoM HCG	MoM UE3	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
MoM AFP	0,168	-0,032	0,034	-0,006	0,059	-0,01	-363	-3,9
MoM HCG	-0,032	0,225	-0,027	0,113	0,232	-0,04	2848	-3,8
MoM UE3	0,034	-0,027	0,125	0,121	0,068	0,07	-773	-4,9
TFF1	-0,006	0,113	0,121	0,741	0,407	0,16	-769	-3,6
TFF2	0,059	0,232	0,068	0,407	2,118	0,46	4351	-4,5
TFF3	-0,010	-0,041	0,072	0,156	0,457	0,73	-2214	-27,4
Transcortin	-362,559	2847,825	-773,324	-768,978	4351,457	-2213,84	186092513	301329,7
s HLA-G	-3,876	-3,761	-4,859	-3,631	-4,531	-27,45	301330	4828,0



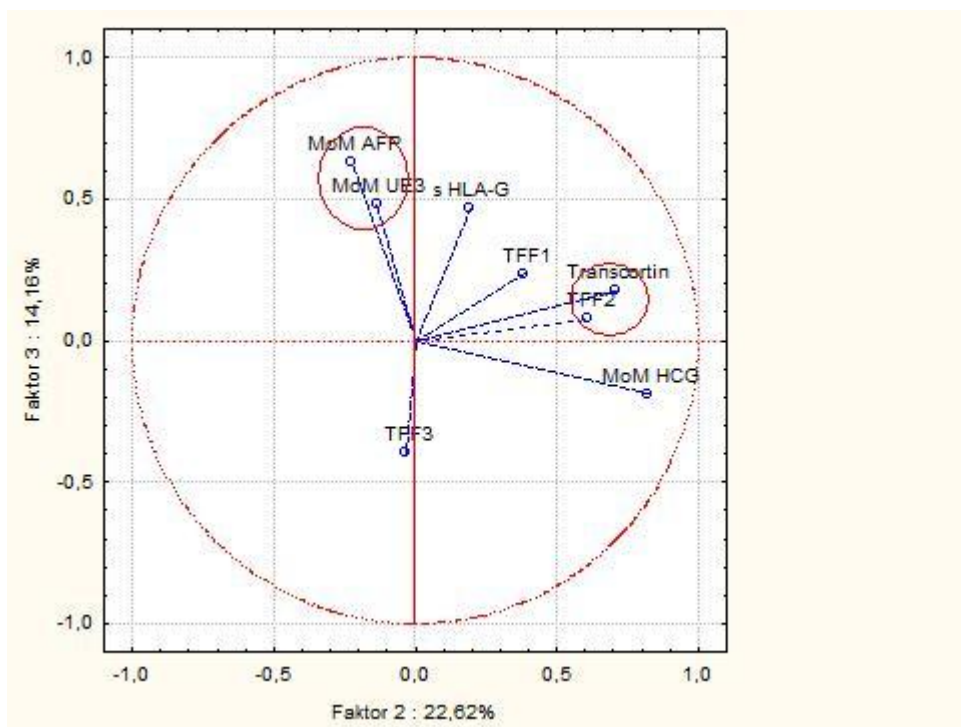
Graf č. 52: Cattelův graf vlastních čísel - Pro tento případ stačí využít čtyři proměnné, aby bylo dosaženo 75,1% statistické variability.



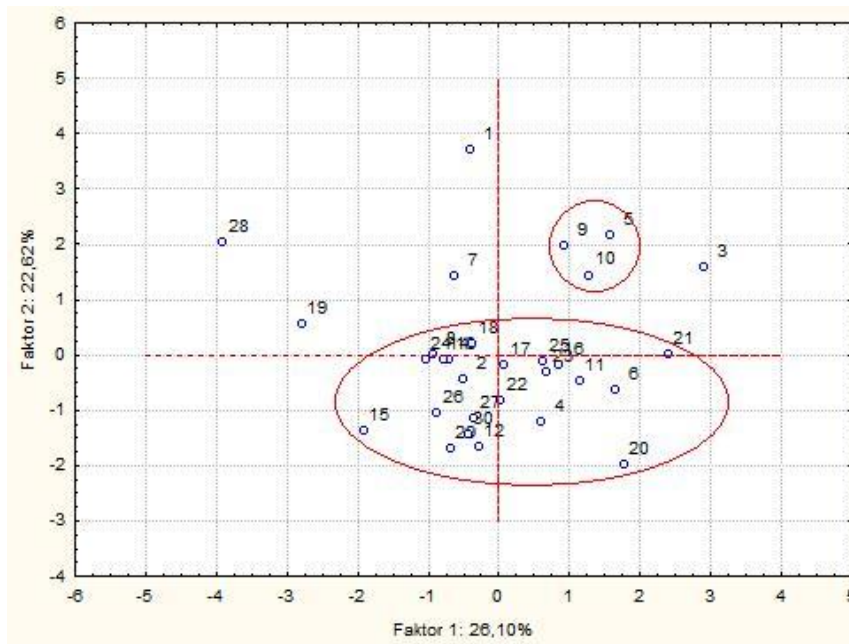
Graf č. 53: Graf komponentních vah 1 a 2 – Znaky lze rozdělit pouze do 1 skupiny, kterou tvoří TFF3 a MoM UE3. Tyto znaky si jsou podobné a mají silnou korelaci.



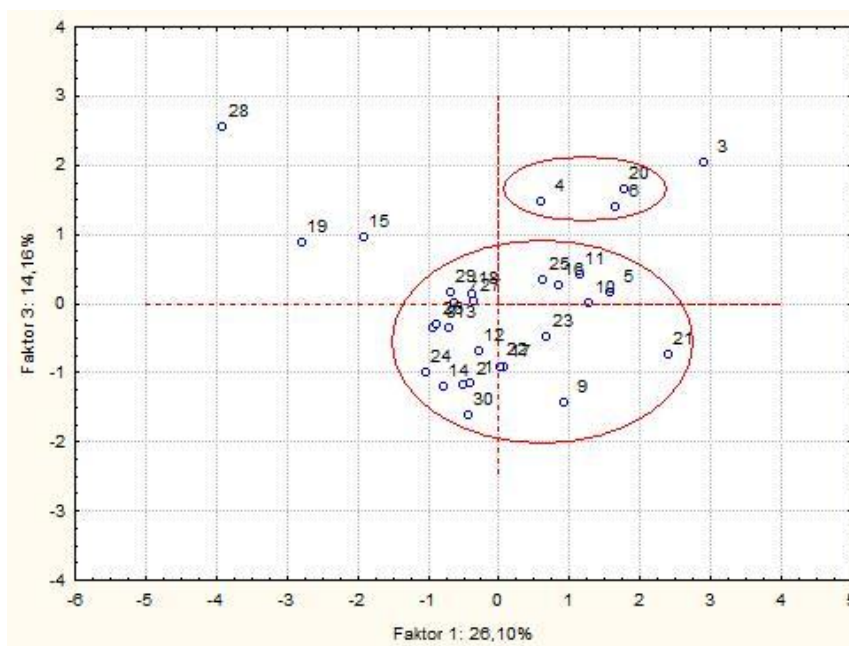
Graf č. 54: Graf komponentních vah 1 a 3 - Znaky lze rozdělit pouze do jedné skupiny, kterou tvoří TFF1 a TFF2.



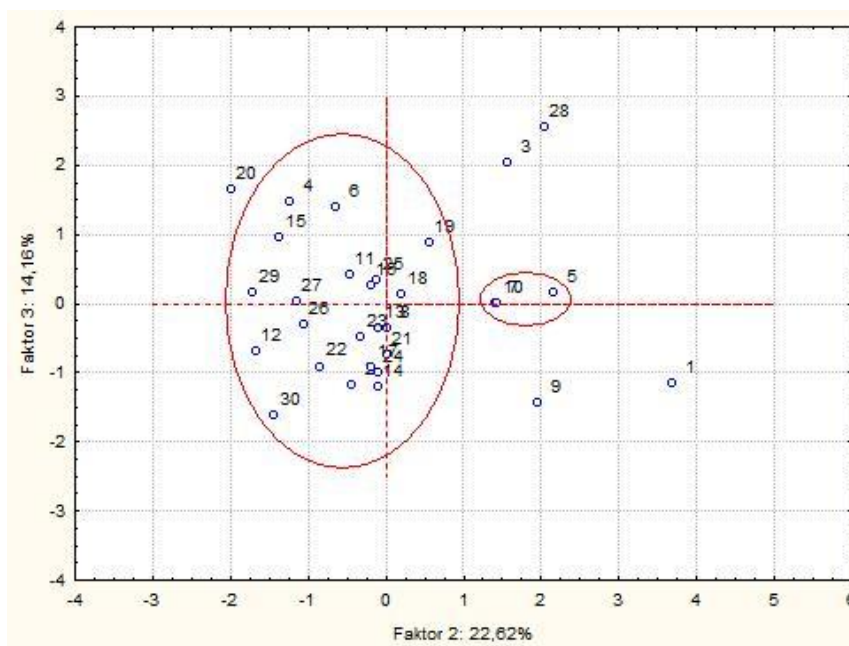
Graf č. 55: Graf komponentních vah 2 a 3 - Znaky lze rozdělit do 2 skupin. První tvoří MoM AFP a MoM UE3. Druhou skupinu znaků tvoří Transcortin a TFF2. Znaky ve skupinách spolu silně korelují.



Graf č. 56: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 2) - Případy tvoří dva shluky, vybočující body 1, 3, 7, 19 a 28 lze považovat za odlehlé body.



Graf č. 57: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 3) - Případy tvoří dva shluky, za odlehlé body lze považovat 3, 15, 19 a 28.



Graf č. 58: Rozptylový diagram komponentního skóre (2 a 3) - Případy tvoří dva shluky, vybočující body 1, 3, 5, 9, 20 a 28 lze považovat za odlehlé body.

10.3.2.2.3. Faktorová analýza

Tab č. 38: Průměrné hodnoty

Proměnná	Průměry	Sm.Odch.
MoM AFP	1,07	0,41
MoM HCG	1,19	0,47
MoM UE3	1,16	0,35
TFF1	0,50	0,86
TFF2	3,01	1,46
TFF3	5,73	0,85
Transcortin	61763,33	13641,57
s HLA-G	75,98	69,48

Sm. Odch. – Směrodatná odchylka

Tab č. 39: Faktorové zátěže

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
MoM AFP	0,248537	-0,224740
MoM HCG	0,019620	0,822194
MoM UE3	0,645426	-0,137063
TFF1	0,579702	0,383777
TFF2	0,483585	0,611901
TFF3	0,733561	-0,034400
Transcortin	-0,347797	0,710372
s HLA-G	-0,616455	0,191245
Výkl.roz	2,087730	1,809391
Prp.celk	0,260966	0,226174

Tab č. 40: Reziduální korelace

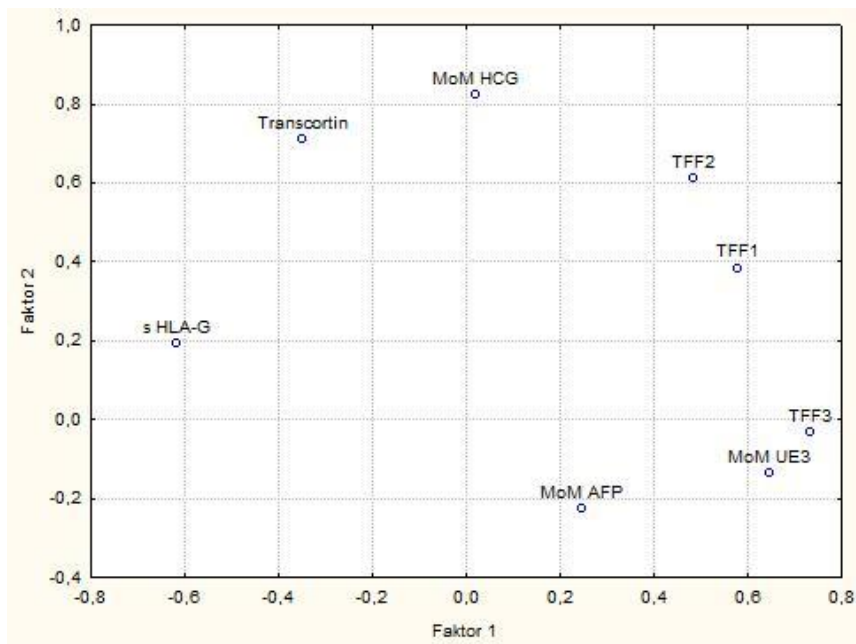
Proměnná	MoM AFP	MoM HCG	MoM UE3	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
MoM AFP	0,89	0,02	0,04	-0,07	0,12	-0,22	0,18	0,06
MoM HCG	0,02	0,32	-0,06	-0,05	-0,18	-0,09	-0,14	-0,26
MoM UE3	0,04	-0,06	0,56	0,08	-0,10	-0,24	0,16	0,23
TFF1	-0,07	-0,05	0,08	0,52	-0,19	-0,20	-0,14	0,22
TFF2	0,12	-0,18	-0,10	-0,19	0,39	0,03	-0,05	0,14
TFF3	-0,22	-0,09	-0,24	-0,20	0,03	0,46	0,09	-0,00
Transcortin	0,18	-0,14	0,16	-0,14	-0,05	0,09	0,37	-0,03
s HLA-G	0,06	-0,26	0,23	0,22	0,14	-0,00	-0,03	0,58

Tab č. 41: Koefficienty faktorového skóre

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
MoM AFP	0,119046	-0,124208
MoM HCG	0,009398	0,454404
MoM UE3	0,309152	-0,075751
TFF1	0,277671	0,212103
TFF2	0,231632	0,338181
TFF3	0,351367	-0,019012
Transcortin	-0,166591	0,392603
s HLA-G	-0,295275	0,105696

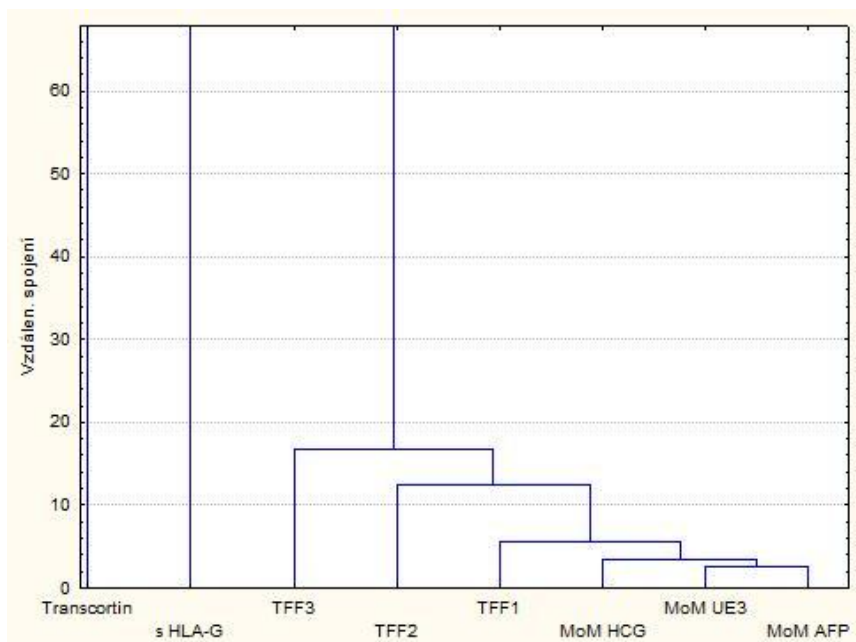
Tab č. 42: Faktorové skóre

Případ	Faktor 1	Faktor 2	15	-1,32088	-1,01726
1	-0,27016	2,74592	16	0,58256	-0,13797
2	-0,34017	-0,32257	17	0,05380	-0,13373
3	2,00735	1,17371	18	-0,25954	0,15448
4	0,41481	-0,91087	19	-1,92966	0,41820
5	1,08907	1,60597	20	1,22971	-1,47573
6	1,14715	-0,47181	21	1,65814	0,00827
7	-0,43168	1,04676	22	0,01860	-0,62404
8	-0,64822	0,00772	23	0,46913	-0,23716
9	0,63653	1,45432	24	-0,71571	-0,07705
10	0,89327	1,06932	25	0,44232	-0,08458
11	0,79474	-0,34284	26	-0,60040	-0,78914
12	-0,19060	-1,24335	27	-0,23582	-0,85539
13	-0,48429	-0,06600	28	-2,70387	1,51777
14	-0,54238	-0,07484	29	-0,46826	-1,27069
			30	-0,29552	-1,06744



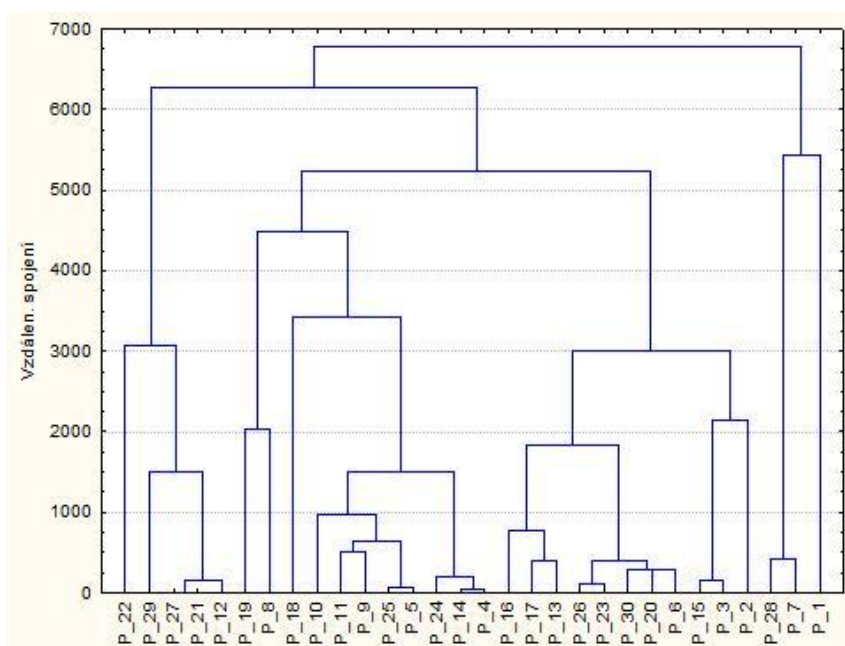
Graf č. 59: Graf faktorových vah 1, 2 – Faktor 1 ukazuje na faktorově čistý znak HLA-G, s kladnou hodnotou faktorové váhy. Zápornou hodnotu faktorové váhy mají znaky TFF3 a MoM UE3. U faktoru 2 mají kladnou hodnotu faktorových vah znaky TFF2 a TFF1.

10.3.2.2.4. Analýza shluků



Graf č. 60: Třásňový graf – znaky - Nejpodobnější znaky jsou MoM UE3 a MoM AFP (skupina 1), dále se připojuje MoM HCG (skupina 2), v další rovině TFF1 (skupina 3), jako další TFF2 (skupina 4), nakonec se připojuje TFF3 (skupina 5). Na

celou skupinu dále nasedá s HLA-G (skupina 5). Znak, který na ostatní navazuje jako poslední je Transcortin, který si je z ostatními znaky nejméně podobný.



Graf č. 61: Třásňový graf – případy - Třásňový graf případů je nepřehledný. Opět dochází k rozdělení podobných případů do skupin.

10.3.2.5. Shrnutí statistiky

Maticový diagram (Graf č. 51) naznačuje lineární rozložení dat a rovněž jejich korelaci. Data jsou rozdělena symetricky, což je vidět z krabicového grafu (Graf č. 50).

Cattelův graf (Graf č. 52) ukazuje, že již první 4 proměnné jsou dostačující pro statistickou variabilitu. Společně dávají hodnotu 75,1 %.

Z grafů komponentního skóre (Grafy č. 56, 57, 58) byly objeveny odlehlé body, za tyto body lze považovat případy 3, 19 a 28.

Shluková analýza (Graf č. 60) ukázala největší podobnost mezi UE3 a AFP. Jednotlivé TFF na sebe opět nasedají a tvoří tak jednu větev.

10.3.3. Třetí trimestr

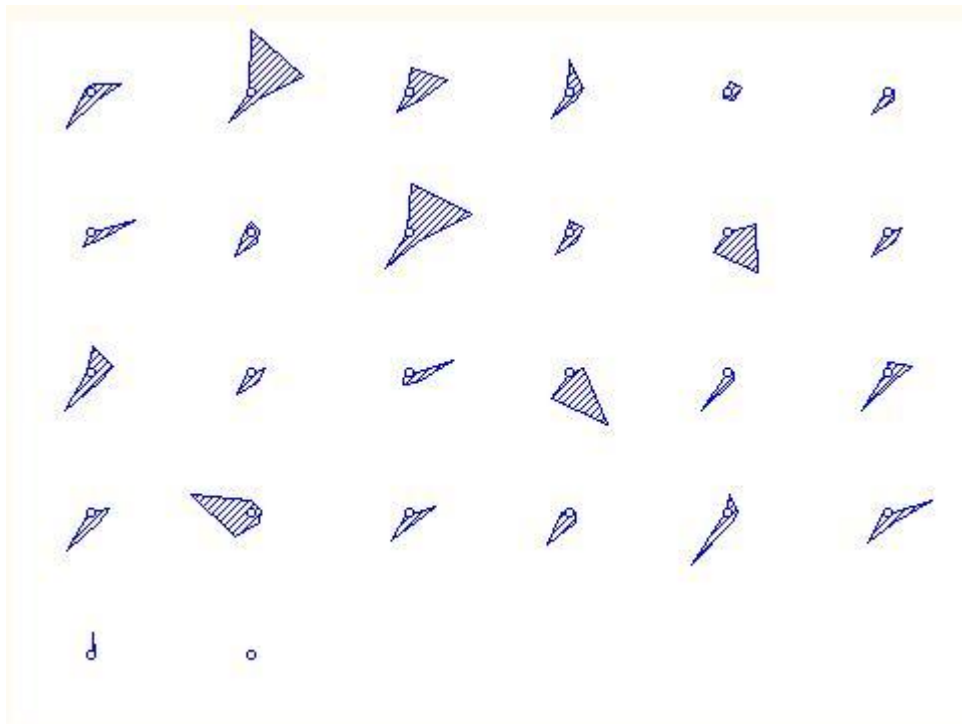
10.3.3.1. Data

Tab č. 43: Naměřená data (Tab. byla doplněna o další data týkající se daného vzorku)

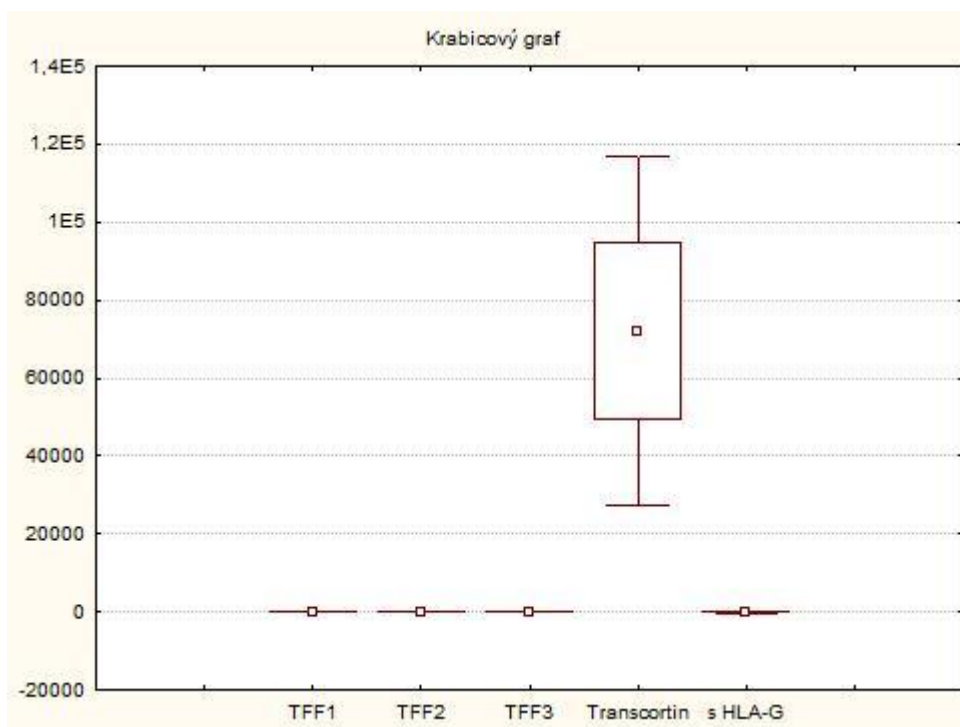
ELISA číslo	I trim	II trim	P/F	TTF 1	TTF 2	TTF3	Transcortin	s HLA-G
				µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
1 - F	neg	neg	0	0,753	31,084	7,195	92080	84,809
2 - F	x	neg	0	4,416	56,359	7,985	81560	41,709
3 - F	x	neg	0	1,833	40,294	8,370	61840	53,149
4 - F	x	x	0	2,335	15,759	7,610	74320	27,791
5 - F	x	x	0	0,768	13,613	7,650	36760	40,581
6 - F	neg	neg	0	0,100	7,400	7,785	66180	14,918
7 - F	neg	neg	0	0,100	45,748	7,715	49600	16,352
8 - F	neg	neg	0	0,884	8,577	7,890	70680	83,662
9 - F	neg	x	0	3,484	64,861	8,085	91980	46,006
10 - F	neg	neg	0	0,979	16,764	7,970	63720	30,064
11 - F	x	x	0	0,100	29,476	35,300	63060	11,706
12 - F	neg	neg	0	0,100	16,060	8,485	69530	30,582
13 - F	x	x	0	1,936	23,105	7,825	97520	70,486
14 - F	x	x	0	0,100	15,699	8,445	64910	46,321
15 - F	x	neg	0	0,100	47,286	8,525	46700	77,614
16 - F	neg	x	0	0,100	15,439	45,15	74100	10,582
17 - F	x	x	0	0,100	6,007	7,410	96690	14,082
18 - F	x	neg	0	0,912	26,339	7,140	95260	31,098
19 - F	x	x	0	0,155	18,654	8,600	94650	39,770
20 - F	x	neg	0	1,056	11,753	8,75	67490	772,183
21 - P	x	neg	1	0,100	27,427	7,375	75550	44,107
22 - P	x	neg	1	0,100	6,985	7,825	82780	104,403
23 - P	neg	neg	1	1,439	10,493	7,160	123440	41,709
24 - P	neg	neg	1	0,100	47,819	8,310	80660	60,570
25 - P	neg	x	1	1,647	3,083	0,865	28310	<0,000
26 - P	x	neg	1	0,100	1,101	1,455	24520	<0,000

* F-fyziologické, P-patologické

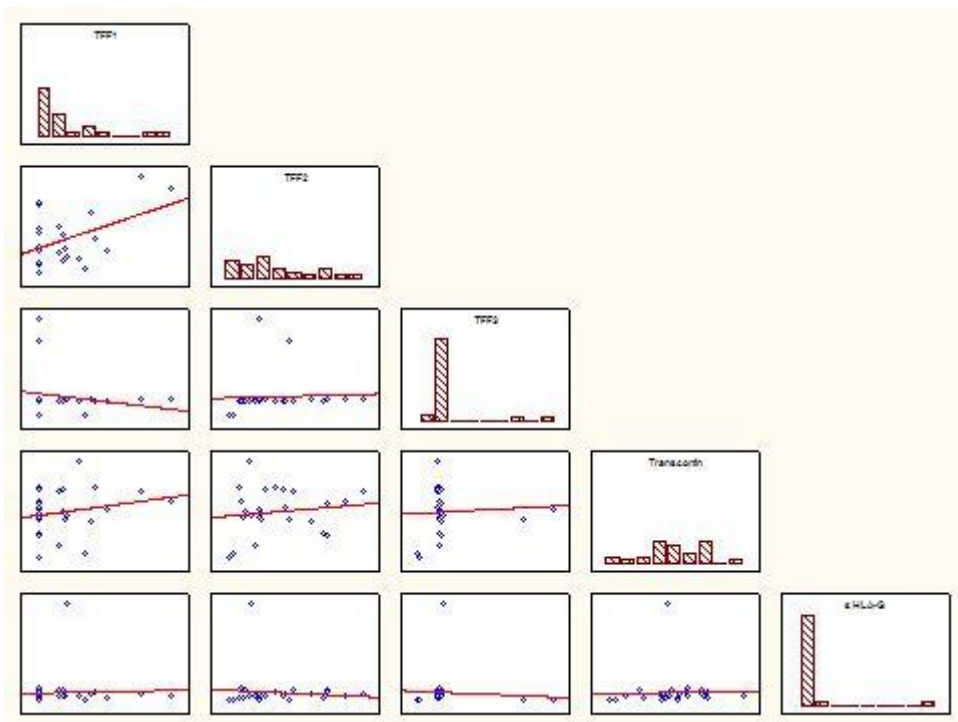
10.3.3.1.1. Exploratorní analýza dat



Graf č. 62: Ikonové grafy - mnohoúhelníky: Na ikonových grafech je vidět, že případy nejsou totožné.



Graf č. 63: Krabicový graf - Z krabicového grafu je vidět symetrické rozdělení dat



Graf č. 64: Maticový diagram korelace znaků - Téměř na všech diagramech je viditelná téměř lineární závislost, tudíž data jsou korelovaná.

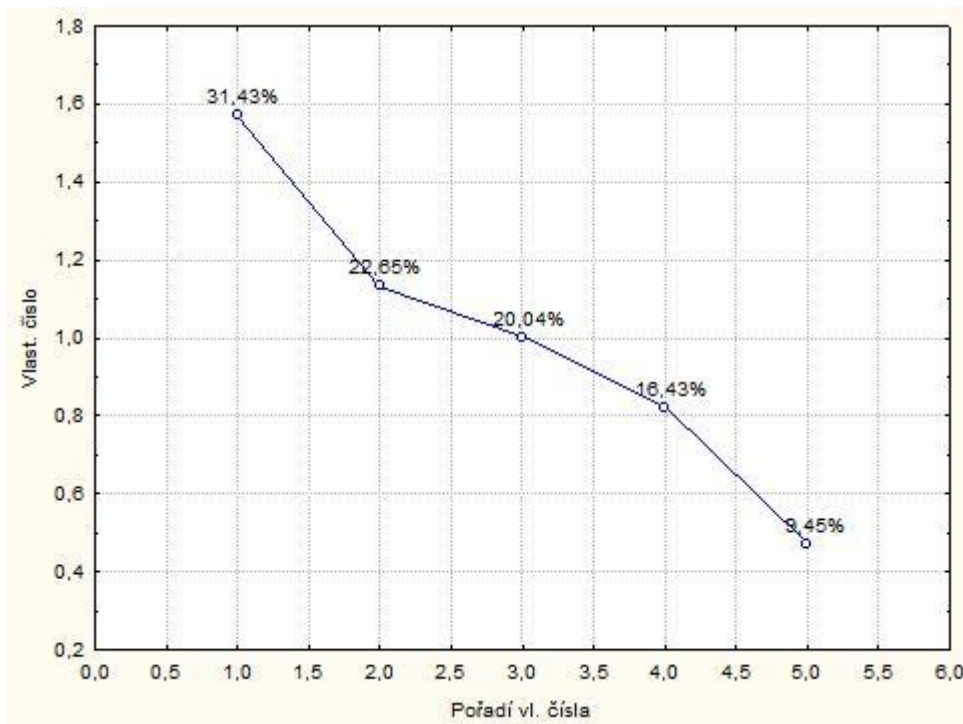
10.3.3.1.2. Analýza hlavních komponent

Tab č. 43: Korelační matice

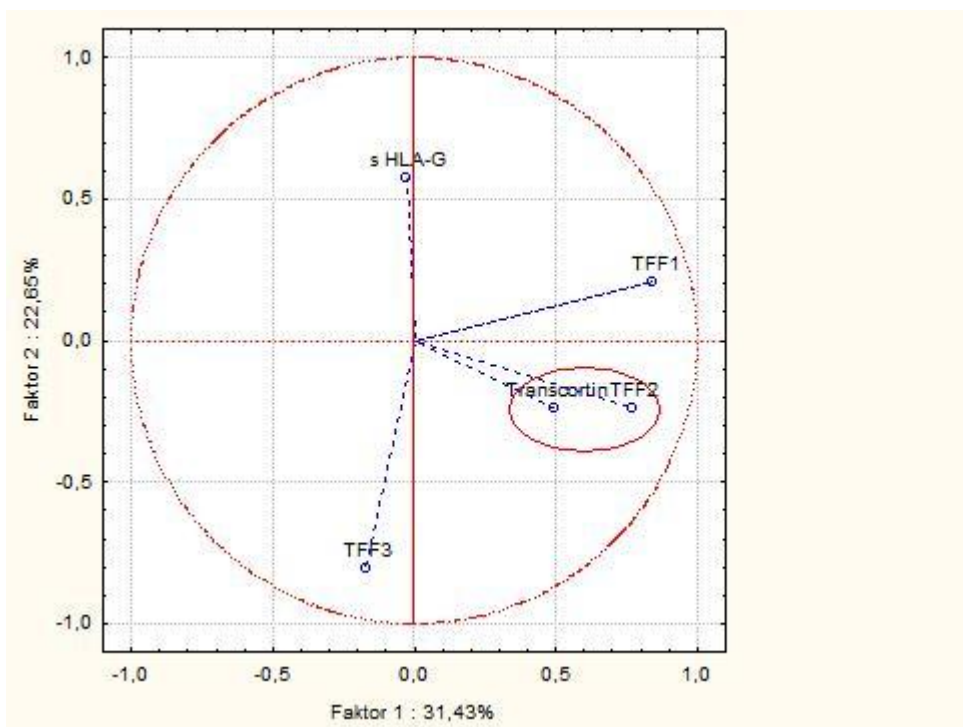
Proměnná	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
TFF1	1,000000	0,443673	-0,202894	0,216802	0,036844
TFF2	0,443673	1,000000	0,047958	0,144146	-0,089979
TFF3	-0,202894	0,047958	1,000000	0,068976	-0,064660
Transcortin	0,216802	0,144146	0,068976	1,000000	0,023608
s HLA-G	0,036844	-0,089979	-0,064660	0,023608	1,000000

Tab č. 44: Kovariační matice

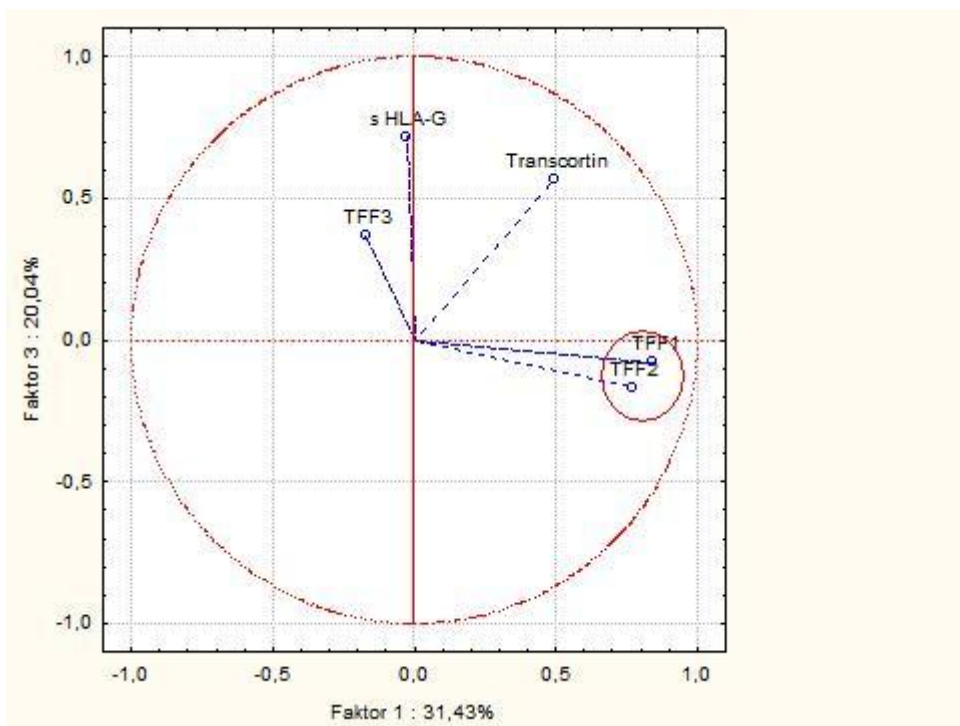
Proměnná	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
TFF1	1,288	8,74	-2,13	5605	6,10
TFF2	8,740	301,40	7,69	57020	-227,98
TFF3	-2,126	7,69	85,30	14515	-87,15
Transcortin	5605,401	57020,43	14515,17	519166308	78502,24
s HLA-G	6,101	-227,98	-87,15	78502	21298,17



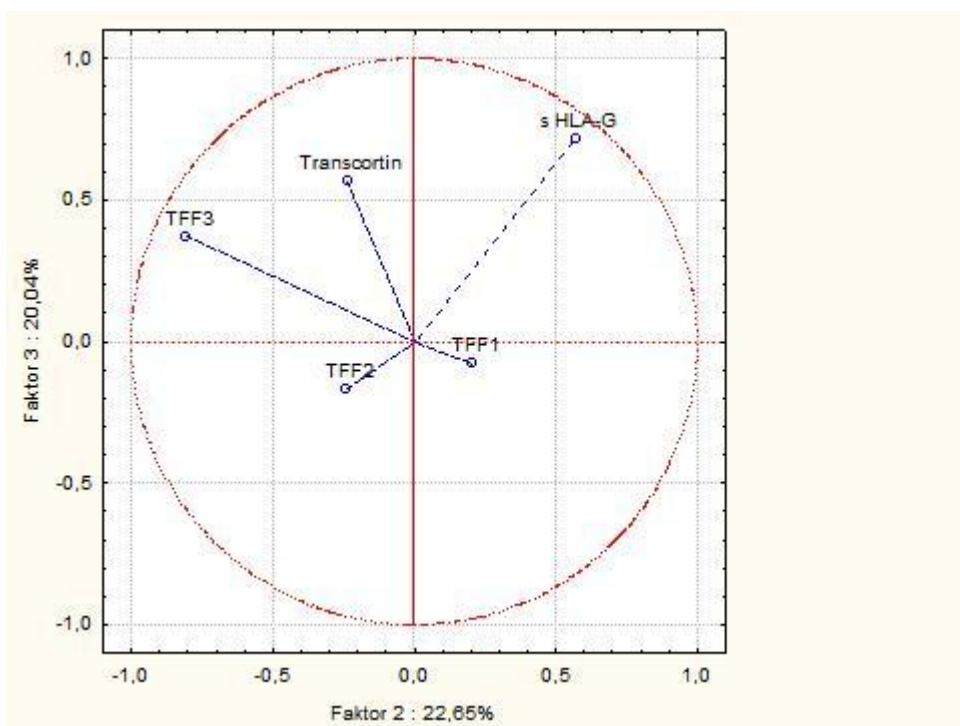
Graf č. 65: Cattelův graf vlastních čísel - Pro tento případ stačí využít tři proměnné, aby bylo dosaženo 74,12% statistické variability.



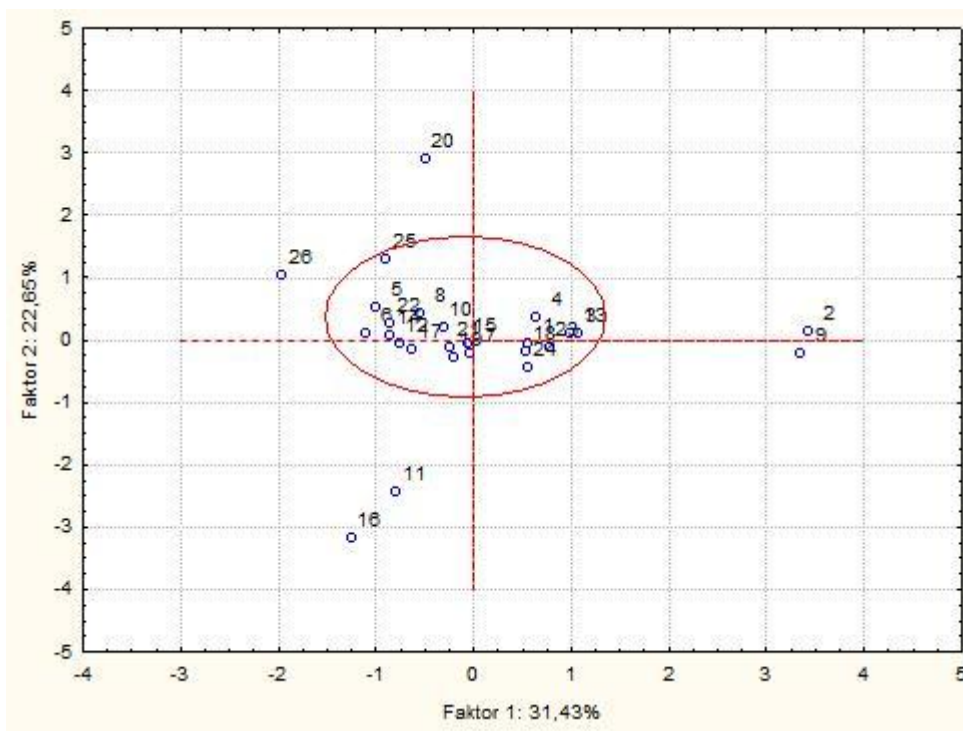
Graf č. 66: Graf komponentních vah 1 a 2 – Znaky lze rozdělit do 1 skupin, kterou tvoří Transcortin a TFF2. Znaky ve skupině mají pozitivní korelaci.



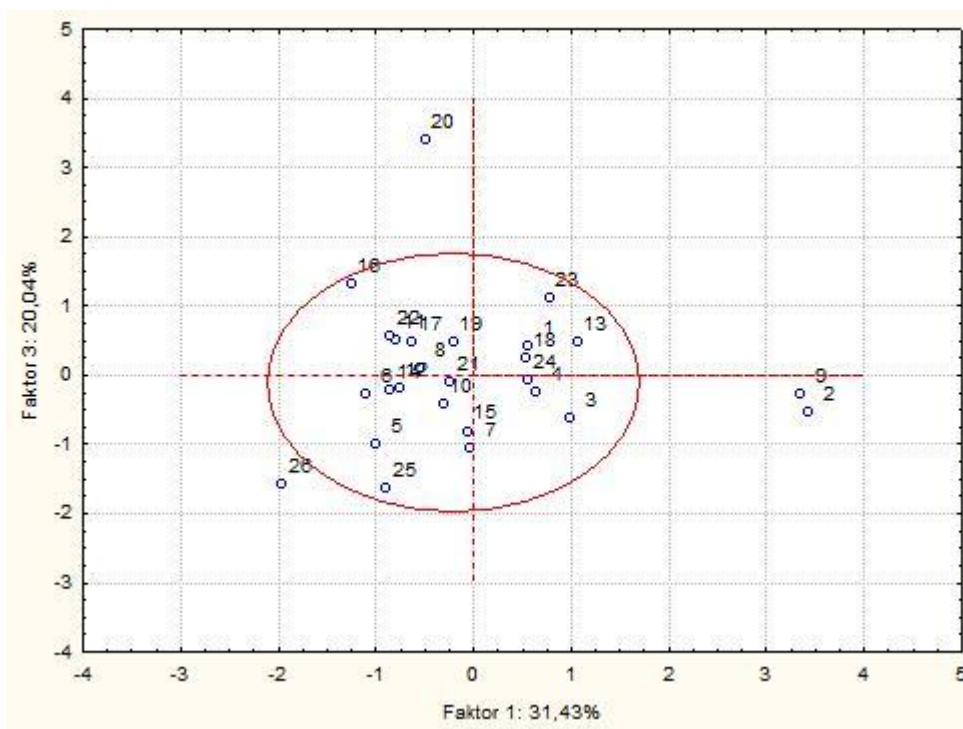
Graf č. 67: Graf komponentních vah 1 a 3 - Znaky lze rozdělit pouze do jedné skupiny, kterou tvoří TFF1 a TFF2. Tyto znaky jsou navzájem silně pozitivně korelované.



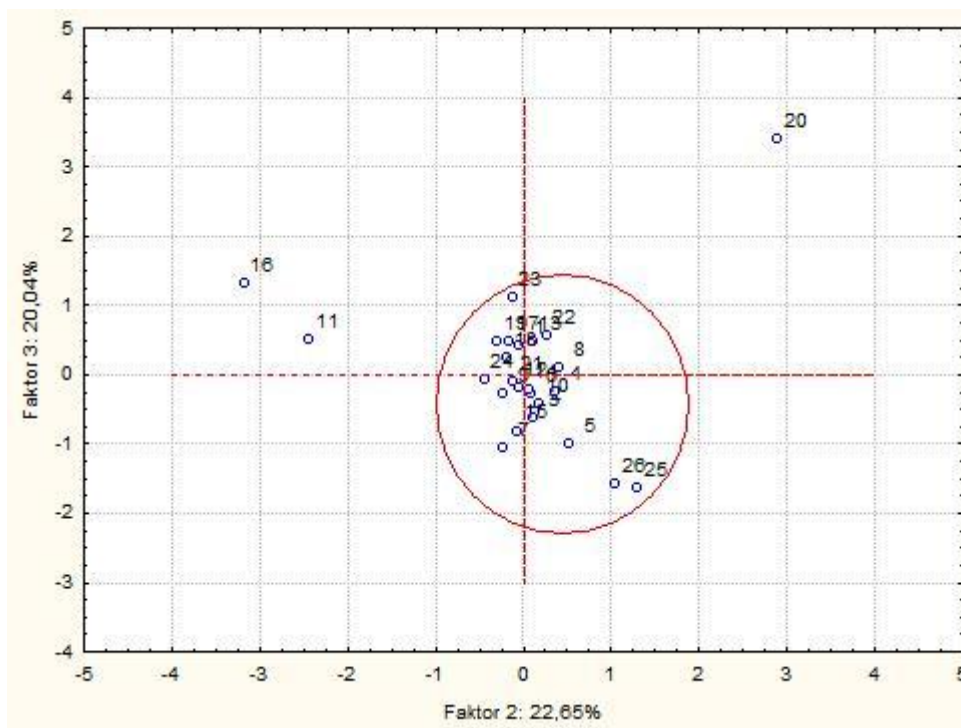
Graf č. 68: Graf komponentních vah 2 a 3 - Znaky nelze rozdělit do skupin.



Graf č. 69: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 2) - Případy tvoří jeden shluk, vybočující body 2, 9, 11, 16, 20 a 26 lze považovat za odlehlé body.



Graf č. 70: Rozptylový diagram komponentního skóre (1 a 3) - Případy tvoří jeden velký shluk, za odlehlé body, který ve shluku neleží lze považovat 2, 9, 20 a 26.



Graf č. 71: Rozptylový diagram komponentního skóre (2 a 3) - Případy tvoří jeden shluk, vybočující body 11, 16 a 20 lze považovat za odlehlé body.

10.3.3.1.3. Faktorová analýza

Tab č. 45: Průměrné hodnoty

Proměnná	Průměry	Sm.Odch.
TFF1	0,92	1,13
TFF2	23,35	17,36
TFF3	9,88	9,24
Transcortin	72072,69	22785,22
s HLA-G	69,01	145,94

Sm. Odch. – Směrodatná odchylka

Tab č. 46: Faktorové zátěže

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
TFF1	0,842365	0,208462
TFF2	0,767943	-0,238474
TFF3	-0,172316	-0,806518
Transcortin	0,491510	-0,236281
s HLA-G	-0,026812	0,570944
Výkl.roz	1,571309	1,132604
Prp.celk	0,314262	0,226521

Tab č. 47: Reziduální korelace

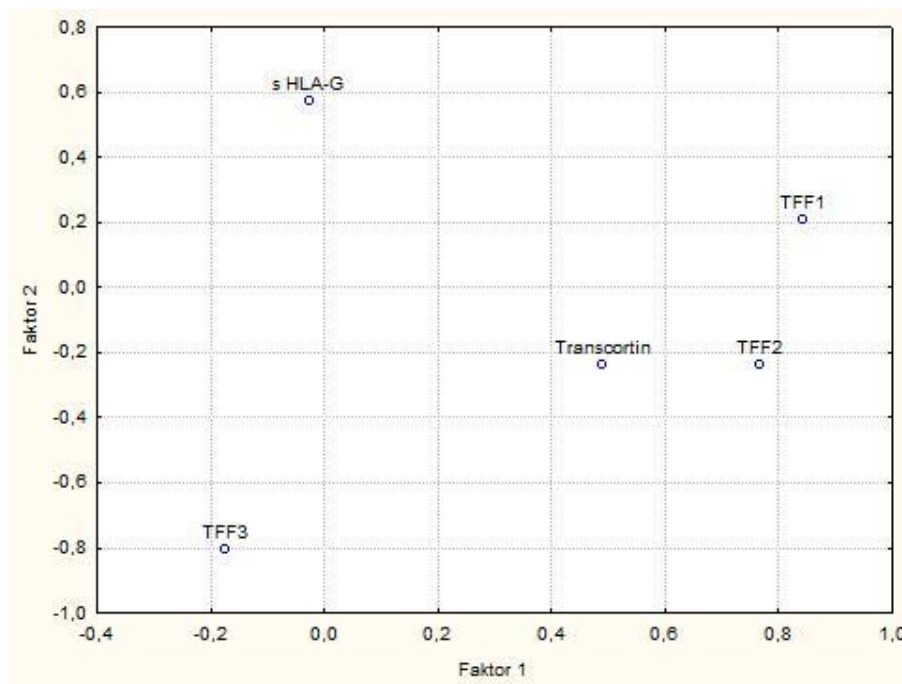
Proměnná	TFF1	TFF2	TFF3	Transcortin	s HLA-G
TFF1	0,25	-0,15	0,11	-0,15	-0,06
TFF2	-0,15	0,35	-0,01	-0,29	0,07
TFF3	0,11	-0,01	0,32	-0,04	0,39
Transcortin	-0,15	-0,29	-0,04	0,70	0,17
s HLA-G	-0,06	0,07	0,39	0,17	0,67

Tab č. 48: Koefficienty faktorového skóre

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
TFF1	0,536091	0,184055
TFF2	0,488728	-0,210554
TFF3	-0,109664	-0,712092
Transcortin	0,312803	-0,208618
s HLA-G	-0,017063	0,504099

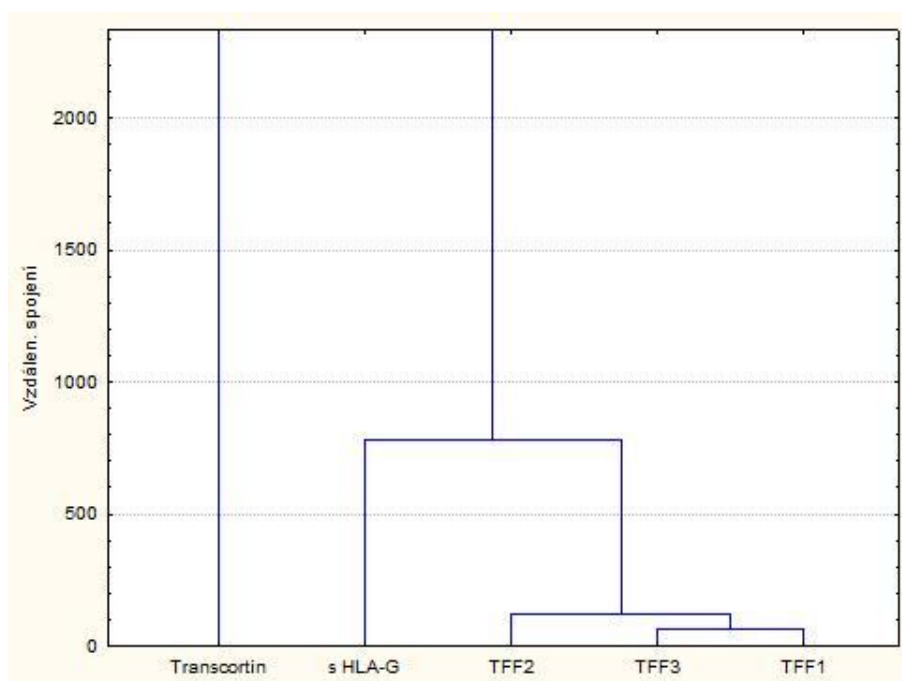
Tab č. 49: Faktorové skóre

Případ	Faktor 1	Faktor 2	13	0,84882	0,09911
			14	-0,67929	0,05843
1	0,44566	-0,04169	15	-0,04468	-0,05601
2	2,73898	0,13246	16	-0,99210	-2,97604
3	0,78978	0,09871	17	-0,49978	-0,14656
4	0,51958	0,33444	18	0,43779	-0,16875
5	-0,79876	0,49128	19	-0,16291	-0,27536
6	-0,88397	0,08987	20	-0,39179	2,72147
7	-0,03139	-0,21306	21	-0,19010	-0,10638
8	-0,42795	0,39092	22	-0,67870	0,24892
9	2,67936	-0,21009	23	0,62608	-0,11399
10	-0,24282	0,17945	24	0,44108	-0,41570
11	-0,63167	-2,28186	25	-0,71061	1,22190
12	-0,60433	-0,04570	26	-1,55631	0,98422



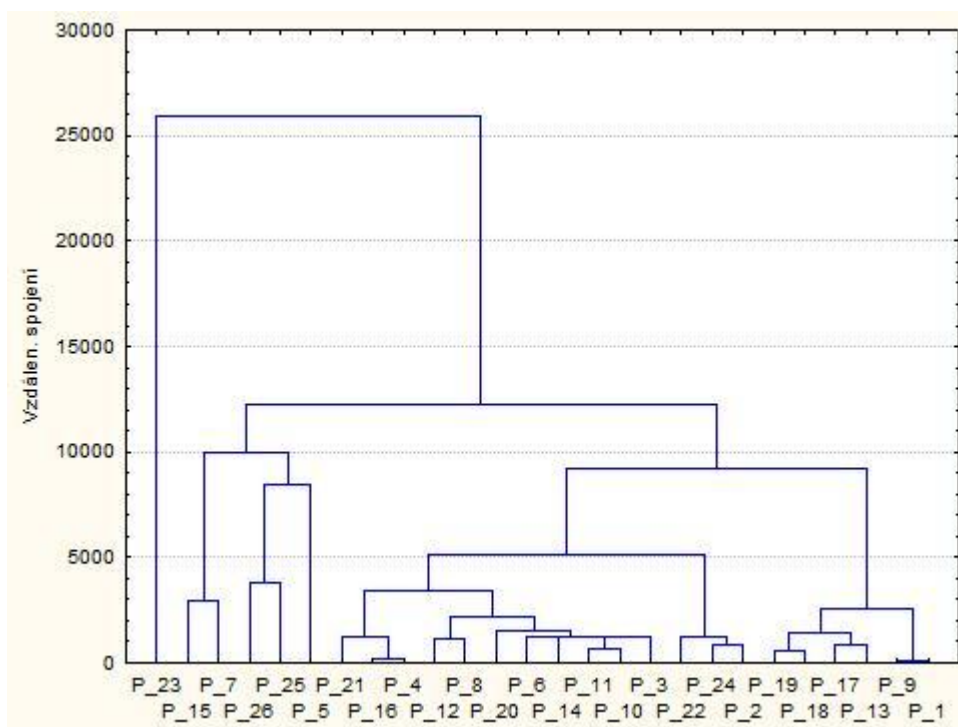
Graf č. 72: Graf faktorových vah 1, 2 – Faktor 1 ukazuje na faktorově čistý znak HLA-G, s kladnou hodnotou faktorové váhy. U faktoru 2 mají kladnou hodnotu faktorových vah znaky TFF1, TFF2. Zápornou hodnotu faktorových vah má TFF3, což znamená, že hodnota znaků roste s klesající hodnotou faktoru 2.

10.3.3.1.4. Analýza shluků



Graf č. 73: Třásňový graf – znaky - Nejpodobnější znaky jsou TFF3 a TFF1 (skupina 1), dále se připojuje TFF2 (skupina 2), na celou skupinu dále nasedá s HLA-G (skupina 1),

3). Znak, který na ostatní navazuje jako poslední je Transcortin, což ukazuje na to, že je vůči ostatním v silně negativní korelaci, nebo s nimi nekoreluje vůbec.



Graf č. 74: Třásňový graf – případy - Třásňový graf případů je nepřehledný. Opět dochází k rozdělení podobných případů do skupin.

10.3.3.1.5. Shrnutí statistiky

Ze základní statistické analýzy vyplývá opět symetrické a lineární rozložení dat (Grafy č. 63, 64), jak je tomu i u prvního a druhého trimestru.

Sutinový graf (Graf č. 65) ukazuje, že jako dostačující jsou první tři proměnné a i tak bude statistická variabilita 74,12 %.

Z grafu komponentních vah 1, 2 (Graf č. 66) vyplývá podobnost mezi TFF2 a transcortinem. Graf komponentních vah 1, 3 (Graf č. 67) ukazuje korelaci mezi TFF1 a TFF2.

Graf komponentního skóre (Grafy č. 69, 70, 71) naznačuje odlehlé body 2, 9, 16, 20 a 26. Shluky bobů v grafech komponentního skóre neprokázaly podobnost nebo viditelné rozdělení mezi fyziologickými a patologickými hodnotami podle povahy vzorku. To se neprojevalo ani v odlehlých bodech.

Shluková analýza (Graf č. 73) naznačuje velikou podobnost všech tří TFF, které se nacházejí na jedné větvi.

10.4. Vztah TFF a vrozených vývojových vad plodu

Ze statistické analýzy vzorků nebyla nalezena souvislost mezi jednotlivými TFF a vrozenými vývojovými vadami plodu.

11. DISKUSE

Vzhledem k tomu, že se jednalo o první práci týkající se stanovení TFF metodou ELISA během jednotlivých trimestrů těhotenství, není možné nalézt mnoho zdrojů k porovnání.

V recentní práci (Samson et. al, 2011) byly zkoumány koncentrace všech tří TFF metodou ELISA po porodu u matky a novorozence. V této studii bylo zjištěno, že při porodu jsou zvýšené sérové hladiny TFF2 a TFF3 přibližně 4-40 krát, což může svědčit o jejich funkci během těhotenství a k jejich roli při vývoji plodu.

Ke podobnému nálezu, nicméně při zcela jiném designu studie, jsme dospěla ve své práci, kdy ve třetím trimestru došlo k významnému zvýšení koncentrace TFF2 a TFF3.

Za statistické analýzy nebyly dle mého očekávání odhaleny souvislosti mezi transkortinem a HLA-G. Rovněž nebyla nalezena souvislost mezi TFF a HLA-G. Jediná korelace byla objevena u TFF3 a transcortinu v I. a II. trimestru. Ve III. trimestru došlo ke korelaci transcortinu a TFF2.

Neprokázali jsme tedy souvislost mezi TFF a výskytem vrozených vývojových vad, přikláním se ke stejnému názoru jako autoři výše jmenované studie, že TFF proteiny hrají důležitou roli při vývoji plodu.

12. ZÁVĚR

Byla provedena verifikace metodik na stanovení TFF1, TFF2 a TFF3. Všechny tři diagnostické soupravy vykazovaly uspokojivé diagnostické charakteristiky.

Bylo ověřeno, že hodnoty TFF jsou měřitelné u gravidních žen a během gravidity byl nalezen významný vzestup TFF2 a TFF3. Zdá se, že tyto parametry by mohly mít význam pro graviditu a vývoj plodu.

Za zajímavé považujeme zjištění, že hodnoty TFF nesouvisí v séru matky s výskytem vrozených vývojových vad plodu.

Překvapením bylo, že se nám nepodařilo nalézt vztah mezi HLA-G a transcortinem. Mezi TFF3 a transcortin byla objevena korelace.

13. SEZNAM LITERATURY

Al-azze E.-d. (2001) Gene regulation of the ruman Trefoil Factor Family (TFF) in gastrointestinal Cell lines, Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Baus-Loncar M., Al-azze E.-d., Romanska H., et al. (2004) Transcriptional control of TFF3 (intestinal trefoil factor) via promoter binding sites for the nuclear factor B and C/EBP. *Peptides* 25, 849–854

Baus-Loncara M., Giraudb A. S. (2005) Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. *Cellular and Moecular Life Sciences* 62, 2921–2931

Bignotti E., Ravaggi A., Tassi R. A., et al. (2008) Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *British Journal of Cancer* 99, 768–773

Bilíková G. (2010). Diplomová práce: Optimalizace elektrochemické detekce hybridizace DNA na uhlíkových elektrodách, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie

Blanchard C., Durual S., Estienne M., et al. (2004) IL-4 and IL-13 Up-regulate intestinal Trefoil Factor expression: Requirement for STAT6 and *de novo* protein synthesis. *The Journal of Immunology* 172, 3775–3783

Blin N. (2005) Cytoprotective trefoil peptides abound in new functions. *Cellular and Moecular Life Sciences* 62, 2907–2909

Bossenmeyer-Pourié C., Kannan R., Ribieras S., et al. (2002) The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 157, 761–770

Buache E., Etique N., Alpy F., et al. (2011) Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. *Oncogene* 1–13

Buron N., Guery L., Creuzat-Garcher C., et al. (2008) Trefoil Factor TFF1-induced protection of conjunctival cells from apoptosis at premitochondrial and postmitochondrial levels. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49, 3790-3798

Caluwaerts S., Vandenbroucke K., Steidler L., et al. (2010) AG013, a mouth rinse formulation of *Lactococcus Laris* secreting human Trefoil Factor 1, provides a safe and efficacious therapeutic tool for treating oral mucositis. *Oral Oncology* 46, 564–570

Cooka G. A., Familiaria M., Thimb L., Girauda A. S. (1999) The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Letters* 456, 155–159

Dardaei L., Shahsavani R., Gnavamzadeh A., et al. (2011) The detection of disseminated tumor cells in bone marrow and peripheral blood of gastric cancer patients by multimarker (CEA, CK20, TFF1 and MUC2) quantitative real-time PCR. *Clinical Biochemistry* 44, 325–330

Dehlawi M. S., Mahida Y. R., Hughes K., Wakelin D. (2006) Effects of *Trichinella spiralis* infection on intestinal pathology in mice lacking interleukin-4 (IL-4) or intestinal trefoil factor (ITF/TFF3). *Parasitology International* 55, 207–211

Devine D., High A. S., Owen P. J., Poulson R., Bonass W. A., (2000) Trefoil Factor expression in normal and diseased human salivary glands. *Human Pathology* 31, 509-515

Dhar D. K., Wang T. C., Maruzama R., et al. (2003) Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. *Laboratory Investigation* 83, 1343-1352

Dhar D. K., Whang T. C., Tabara H., et al. (2005) Expression of Trefoil Factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin Cancer Res* 11, 6472-6478

Dubeykovskaya Z., Dubeykovskiy A., Solal-Cohen J., Wang T. C. (2009) Secreted Trefoil Factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *The Journal of Biological* 284, 3650–3662

Emamia S., Floch N. L., Bruyneel E., et al. (2001) Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *The FASEB Journal* 15, 351–361

Emamia S., Rodrigues S., Rodrigue C. M., et al. (2004) Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 25, 885–898

Espino P. S., Li L., He S., Yu J., Davie J. R. (2006) Chromatin modification of the Trefoil Factor 1 gene in human breast cancer cells by the ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 66, 4610-4616

Fernández-Estívariz C., Gu L. H., Gu L., et al. (2003) Trefoil peptide expression and goblet cell number in rat intestine: effects of KGF and fasting-refeeding. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284, 564–573

Fueger P. T., Chrisler J. C., Lu D., et al. (2008) Trefoil Factor 3 stimulates human and rodent pancreatic islet β -cell replication with retention of function. *Molecular Endocrinology* 22, 1251–1259

Graness A., Chwieralski C. E., Reinhold D., Thim L., Hoffmann W. (2002) Protein kinase C and ERK activation are required for TFFpeptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 18440–18446,

Greeley M. A., Van Winkle L. S., Edwards P. C., Plopper C. G. (2010) Airway Trefoil Factor expression during naphthalene injury and repair. *Toxicological Sciences* 113, 453–467

Haruhiko O., Makoto T.K., Dongfeng T., et al. (2005) Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *International Journal of Oncology* 26, 369–377

Hernández C., Santamatilde E., McCreath K. J., et al. (2009) Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. *British Journal of Pharmacology* 156, 262–272

Hinz M., Schwegler H., Chwieralski C.E., et al. (2004) Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides* 25, 827–832

Hoffmann W. (2005) TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 2932–2938

Chi A. L., Lim S. H., Wang T. C. (2004) Characterization of a CCAAT-enhancer element of trefoil factor family 2 (TFF2) promoter in MCF-7 cells. *Peptides* 25, 839–847

Chinery R., Williamson J., Poulson R. (1996) The gene encoding human intestinal Trefoil Factor (TFF3) is located on chromosome 21q22.3 clustered with other members of the trefoil peptide family. *Genomics* 32, 281–284

Chutipongtanate S., Nakagawa Y., Sritippayawan S., et al. (2005) Identification of human urinary trefoil factor 1 as a novel calcium oxalate crystal growth inhibitor. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 3613–3622

Chwieralski C. E., Schnurra I., Thim L., Hoffmann W. (2004) Epidermal growth factor and Trefoil Factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31, 528–537

Jackerott M., Lee Y. C., Møllgard K., et al. (2006) Trefoil Factors are expressed in human and rat endocrine pancreas: differential regulation by growth hormone. *Endocrinology* 147, 5752–5759

Jangle W., Wiede A., Dietzmann K., Rutkowski K., Hoffmann W. (2000) 1 Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus. *The FASEB Journal* 14, 1126–1131

Kalabis J., Rosenberg I., Podolsky D. K. (2006) Vangl1 protein acts as a downstream effector of intestinal Trefoil Factor (ITF)/TFF3 signaling and regulates wound healing of intestinal epithelium. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 6434–6441

Karam S. M., Tomasetto C., Rio M-C. (2004) Trefoil factor 1 is required for the commitment programme of mouse oxyntic epithelial progenitors. *Gut* 53, 1408-1415

Kato S., Matsukura N., Togashi A., et al. (2004) Sex differences in mucosal response to *Helicobacter pylori* infection in the stomach and variations in interleukin-8, COX-2 and trefoil factor family 1 gene expression. *Aliment Pharmacol Ther* 20, 17–24.

Kawai T., Takagi Y., Fukuzawa M., Yamagishi T., Goto S. (2011) 3 The role of trefoil factor family in apparently healthy subjects administered gastroprotective agents for the primary prevention of gastrointestinal injuries from low-dose acetylsalicylic acid: a preliminary study. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 49, 136–140

Kinoshita K., Taupin D. R., Itoh H., Podolsky D. K. (2000) Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal Trefoil Factor. *Molecular and cellular biology* 20, 4680–4690

Kosriwong K., Menheniott T. R., Giraud A. S., Jearanaikoon P., Sripa B., Limpai boon T. (2011) Trefoil factors: Tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma. *World Journal of Gastroenterol* 17, 1631-1641

Kouznetsova I., Chwieralski C. E., Bälder R., et al. (2007) Induced Trefoil Factor family 1 expression by trans-differentiating clara cells in a murine asthma model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 36, 286–295,

Langer G., Jagla W., Behrens–Baumann W., Walter S., Hoffmann W. (1999) Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40, 2220-2224

Lemberger S. I. K., Dorsch R., Hauck S. M., et al. (2010) Decrease of Trefoil factor 2 in cats with feline idiopathic cystitis. *BUJ international* 107, 670–677

LeSimple P., van Seuning en I., Buisine M.-P., et al. (2007) Trefoil Factor Family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 36, 296–303

Liang B., Jiang S. F. Cai F. F., Zhuang Q., Yu K. (2009) Intestinal trefoil factor maybe useful in prophylaxis of acute graft-versus-host Disease. *Medical Hypotheses* 73 519–520

Loncar M. B., Al-azzeh E.-d., Sommer P. S. M., et al. (2003) Tumour necrosis factor α and nuclear factor κ B inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut* 52, 1297–1303

Madsen J., Nielsen O., Tornøe I., Thim L., Holmskov U. (2007) Tissue localization of human Trefoil Factors 1, 2, and 3. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 55, 505–513

Mahmood A., Melley L., Fitzgerald A. J., Ghosh S., Playford R. J. (2005) Trial of trefoil factor 3 enemas, in combination with oral 5-aminosalicylic acid, for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 21, 1357–1364.

Marchbank T., Cox H. M., Goodland R. A., et al. (2001) Effect of ectopic expression of rat Trefoil Factor family 3 (Intestinal Trefoil Factor) in the jejunum of transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 24088–24096

Moss S. F., Lee J.-W., Sabo E., et al. (2008) Decreased expression of gastrokine 1 and the Trefoil Factor interacting proteinTFIZ1/GKN2 in gastric cancer: Influence of tumor histology and relationship to prognosis. *Clin Cancer Res* 14, 4161-4167

Newton J. L., Allen A., Westley B. R., May F. E. B. (2000) The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 46, 312–320

Nikolaidis N. M., Zimmermann N., King N. E., et al. (2003) Trefoil Factor-2 is an allergen-induced gene regulated by T_H2 cytokines and STAT6 in the lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29, 458–464,

Oertel M., Graness A., Thim L., Bühling F., Kalbacher H., Hoffmann W. (2001) Trefoil Factor Family – peptides promote migration of human bronchial epithelial cells synergistic effect with epidermal growth factor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25, 418–424

Okada H., Kimura M. T., Tan D., et al. (2005) Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *International Journal of Oncology* 26, 369–377

Paulsen F. P., Hinz M., Schaudig U., Thale A. B., Hoffmann W. (2002) TFF peptides in the human efferent tear ducts investigative. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43, 3359-3363

Paulsen F. P., Wonn C.-W., Varoga D., et al. (2008) Intestinal Trefoil Factor/TFF3 promotes Re-epithelialization of corneal wounds. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 13418–13427

Pera M., Heppell J., Poulson R., Teixeira F. V., Williams J. (2001) Ulcer associated cell lineage glands expressing trefoil peptide genes are induced by chronic ulceration in ileal pouch mucosa. *Gut* 48, 792–796

Perry J. K., Kannan N., Grandison P. M., Mitchell M. D., Lobie P. E. (2007) Are trefoil factors oncogenic? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19, 74–81

Peterson D. E., Barker N. P., Akhmadullina L. I., et al. (2009) Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study of recombinant human intestinal trefoil factor oral spray for prevention of oral mucositis in patients with colorectal cancer who are receiving fluorouracil-based chemotherapy. *International Journal of Oncology* 27, 4333-4338

Poulsen S. S., Thulesen J., Nexø E., Thim L. (1998) Distribution and metabolism of intravenously administered trefoil factor 2/porcine spasmolytik polypeptide in the rat. *Gut* 43, 240–247

Poulsen S. S., Thulesen J., Christensen L., Nexø E., Thim L. (1999) Metabolism of oral trefoil factor 2 (TFF2) and the effect of oral and parenteral TFF2 on gastric and duodenal ulcer healing in the rat. *Gut* 45, 516–522

Prest S. J., May F. E. B., Westley B. (2002) The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *The FASEB Journal* 16, 392-394

Qi G., Li J., Wang S., et al. (2011) A chimeric peptide of intestinal trefoil factor containing cholesteryl ester transfer protein B cell epitope significantly inhibits atherosclerosis in rabbits after oral administration. *Peptides* 32, 790–796

Radloff D. R., Wakemana T. P., Fenga J., Schillinga S., Setoc E., Wanga X-F. (2011) Trefoil factor 1 acts to suppress senescence induced by oncogene activation during the cellular transformation process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 6591–6596

Rivat C., Rodrigues S., Bruyneel E., et al. (2005) Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) – and vascular endothelial growth factor–mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res* 65, 195-202

Rodrigues S., Attoub S., Nguyen Q.-D., et al. (2003) Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 22, 4488–4497

Rodrigues S., van Aken E., van Boexlaer S., et al. (2003) Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *The FASEB Journal* 17, 7–16

Ruchaud-Sparagano M.-H., Westley B. R., May F. E. B. (2004) The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 1946–1954

Samsona M. H., Vestergaard E. M., Milman N., Poulsen S. S., Nexø E. (2008) Circulating serum trefoil factors increase dramatically during pregnancy the Scandinavian. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 1, 1–6

Samson M. H., Poulsen S. S., Obeid R., Herrmann W., Nexø E. (2011) Trefoil factor family peptides in the human foetus and at birth. *European Journal of Clinical Investigation* 41, 785–792

Sasaki M., Tsuneyama K., Nakanuma Y. (2003) Aberrant expression of trefoil Factor family 1 in biliary epithelium in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Laboratory investigation* 83, 1403–1413

Sasaki M., Ikeda H., Ohira S., Ishikawa A., Nakanuma Y. (2004) Expression of trefoil factor family 1, 2, and 3 peptide is augmented in hepatolithiasis. *Peptides* 25, 763–770

Sasaki M., Ikeda H., Nakanuma Y. (2007) Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system: physiological distribution and pathological significance. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 42, 61–110

Shimada T., Fujii Y., Koike T., et al. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) regulates trefoil factor family 2 (TFF2) expression in gastric epithelial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 626–637

Song M., Xia B., Li J. (2006) Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1 β , and nuclear factor κ B in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Postgraduate Medical Journal* 82, 130–135

Suemori S., Lynch-Devaney K., Podolsky D. K. (1991) Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: Tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 88, 11017–11021

Takano T., Miyauchi A., Yoshida H., Kuma K., Amino N. (2004) High-throughput differential screening of mRNAs by serial analysis of gene expression: decreased expression of trefoil factor 3 mRNA in thyroid follicular carcinomas. *British Journal of Cancer* 90, 1600–1605

Tan X.-D., Chen Y.-H., Liu Q.-P., Gonzalez-Crussi F., Liu X.-L. (2000) Prostanoids mediate the protective effect of trefoil factor 3 in oxidant-induced intestinal epithelial cell injury: role of cyclooxygenase-2. *Journal of Cell Science* 113, 2149–2155

Thima L., May F. E. B. (2005) Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 2956–2973

- Tomasetto C., Masson R., Linares J.-L., et al.** (2001) Interaction of trefoil family factors with mucins: clues to their mechanism of action? *Gut* 48, 293–294
- Tosco A., Monti M. C., Fontanella B., et al.** (2007) Copper-binding activity of trefoil factor 1 (TFF1): A new perspective in the study of the multifunctional roles of TFFs. *Peptides* 28, 1461–1469
- Vestergaard E. M., Poulsen S. S., Grønbæk H., et al.** (2002) Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3. *Clinical Chemistry* 48, 1689–1695
- Vestergaard E. M., Borre M., Poulsen S. S., Nexø E., Tørring N.** (2006) Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer clin. *Clin Cancer Res* 12, 807–812
- Wong W. M., Poulson R., Wright N. A.** (1999) Trefoil peptides. *Gut* 44, 890–895
- Xue H., Lü B., Zhang J., et al.** (2010) Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. *Journal of Proteome Research* 9, 545–555
- Yamachika T., Werther J. L., Bodian C., et al.** (2002) Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma¹. *Clinical Cancer Research* 8, 1092–1099
- Yeh T.-S., Jan Y.-Y., Chin C.-T., et al.** (2002) Characterisation of oestrogen receptor, progesterone receptor, trefoil factor 1, and epidermal growth factor and its receptor in pancreatic cystic neoplasms and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 51, 712–716
- Yu K., Jiang S.-F., Lin M.-F., Wu J.-B., Lin J.** (2004) Extraction and purification of biologically active intestinal trefoil factor from human meconium. *Laboratory Investigation* 84, 390–392

Zhang Y., Yu G., Xiang Y., et al. (2010) Bm-TFF2, a toad trefoil factor, promotes cell migration, survival and wound healing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398, 559–564

Zhu Y.-Q., Tan X.-D. (2005) TFF3 modulates NF- κ B and a novel negative regulatory molecule of NF- κ B in intestinal epithelial cells via a mechanism distinct from TNF- α . *American Physiological Society* 289, 1085–1093

<http://www.zdrava-rodina.cz/med/med1202/med120218.html> (staženo 12.11.2010)

<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-1-human-elisa> (staženo 12.11.2010)

<http://www.biovendor.com/country315/product/immunoassays/trefoil-factor-2-human-elisa> (staženo 12.11.2010)

<http://www.biovendor.com/product/immunoassays/trefoil-factor-3-human-elisa> (staženo 12.11.2010)

<http://www.uniprot.org/uniprot/P04155> (citace 25.10.2011)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q03403> (citace 25.10.2011)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q07654> (citace 25.10.2011)