

**Univerzita Palackého Olomouc
Lékařská fakulta**

Nové sérové markery u karcinomu endometria

Disertační práce

MUDr. David Neubert

Školitel: prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....
Vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji svému školiteli, prof. MUDr. Radovanu Pilkovi, Ph.D., který mě v průběhu celého doktorského studia vedl a ochotně předával své rady a zkušenosti týkající se studia samotného, především pak v oblasti onkogynekologie.

Dále děkuji prof. MUDr. Davidu Stejskalovi, Ph.D. a Mgr. Gabriele Krejčí z oddělení laboratorní medicíny Středomoravské nemocniční a.s. za vstřícnost a spolupráci při zpracování vzorků.

OBSAH

1. Úvod

- 1.1 Epidemiologie karcinomu endometria
- 1.2 Rizikové faktory karcinomu endometria
- 1.3 Protektivní faktory karcinomu endometria
- 1.4 Klinické projevy
- 1.5 Diagnostika, vyšetřovací metody

2. Prognostické faktory karcinomu endometria

3. Histopatologické charakteristiky karcinomu endometria

4. Molekulární patogeneze karcinomu endometria

- 4.1 Onkogeny a tumor supresorové geny
- 4.2 Molekulární biologie a histologické podtypy karcinomu endometria

5. Sérové markery

- 5.1 Ca125
- 5.2 HE4
- 5.3 Ca15.3
- 5.4 VEGF
- 5.5 PLGF
- 5.6 YKL-40
- 5.7 AMH
- 5.8 DJ-1

6. Další potencionální markery

- 6.1 S100-A11
- 6.2 AIF-1
- 6.3 TFF

7. Cíl práce a pracovní hypotéza

8. Materiál a metodika

8.1 Charakteristika souborů

8.2 Vyšetření vzorků

8.2.1 Vyšetření TTF1-3, S100-A11 a AIF-1 v séru

8.2.2 Vyšetření kynureninu, tryptofanu, neopterinu a kreatininu v séru

8.2.3 Vyšetření retinolu a alfa-tokoferolu v séru

8.2.4 Vyšetření vitamínu D v séru

8.2.5 Vyšetření citrulinu v séru

8.2.6 Vyšetření C reaktivního proteinu (CRP) v séru

8.2.7 Vyšetření interleukinu-6 (IL-6) v séru

8.2.8 Vyšetření neopterinu v moči

8.3 Statistické hodnocení

9. Výsledky

9.1 Hladiny TFF1, TFF2, TFF3

9.2 Hladiny TFF3, S100-A11, AIF-1

9.3 Hladiny TFF3, S100-A11, AIF-1 v korelaci s markery zánětlivé odpovědi

10. Diskuse

11. Závěr

12. Souhrn

13. Summary

14. Seznam publikací a přednášek

14.1 Práce související s disertační prací

14.2 Ostatní publikace

15. Použitá literatura

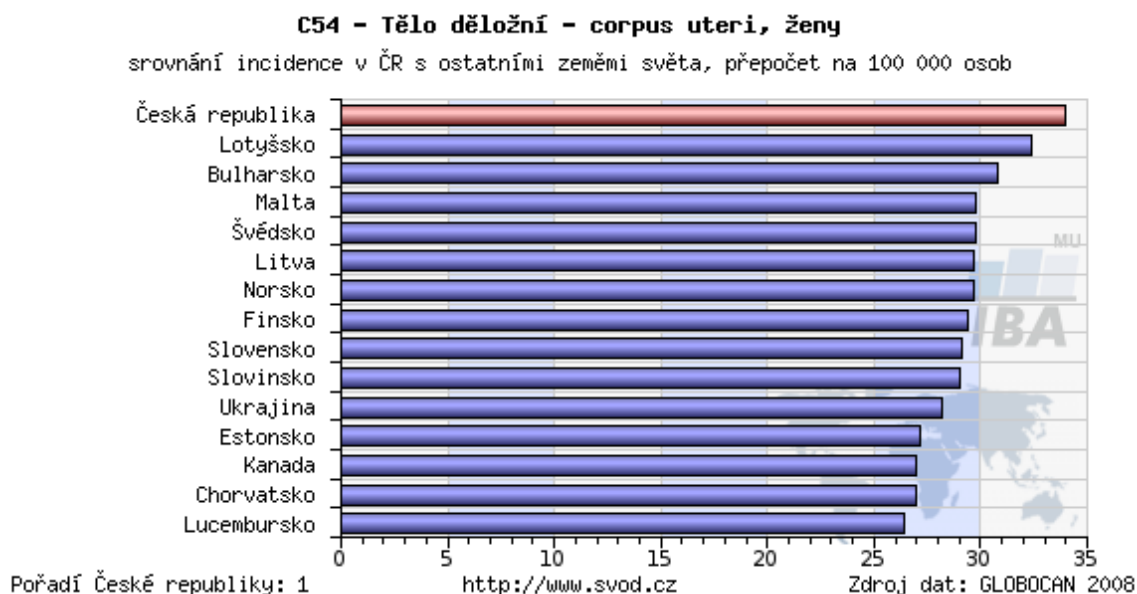
16. Přílohy

1. Úvod

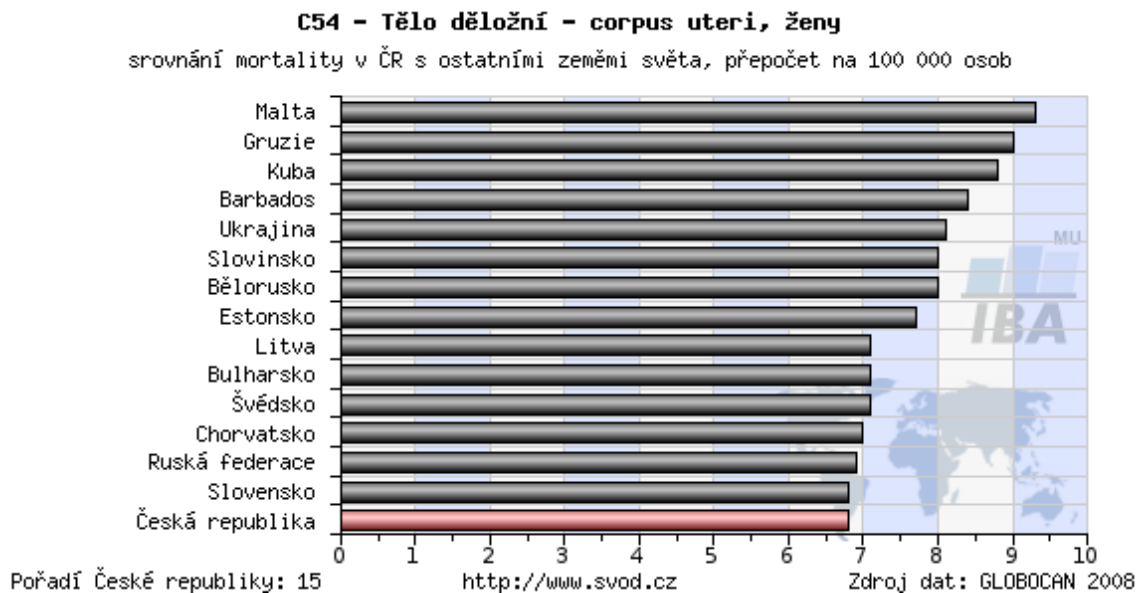
1.1 Epidemiologie karcinomu endometria

Karcinom endometria (EC) se řadí k nejčastěji se vyskytujícím zhoubným nádorům v rozvinutých zemích [1]. Jeho incidence dále stoupá [2]. Celoživotní riziko vzniku karcinomu endometria u žen je 2-3% [2]. Je šestou nejčastější malignitou u žen celosvětově s odhadovanou incidencí okolo 319 600 nových případů za rok (2013) [3]. V USA je karcinom endometria dokonce čtvrtým nejčastěji se vyskytujícím maligním onemocněním u žen [4]. V Evropě počet nově diagnostikovaných případů překračuje hranici 100 000 žen ročně v roce 2012 [1]. Po zhoubných nádorech prsu je druhou nejčastější gynekologickou malignitou. V České republice se gynekologické zhoubné nádory podílí přibližně 15 % na celkovém počtu všech nádorových onemocnění u žen. V roce 2014 dosáhla v ČR incidence karcinomu endometria hodnoty 35,3/100 000 žen. Dle absolutních čísel v tomto roce onemocnělo 1892 žen. Stále však incidence a především mortalita v České republice převyšují jak evropský tak i světový standard (graf 1, 2; tabulka 1,2).

Graf č.1: Incidence karcinomu endometria v České republice a vybraných zemích
(zdroj: www.svod.cz)



Graf č.2: Srovnání mortality v České republice a vybraných zemích
(zdroj: www.svod.cz)



Tabulka č.1: Incidence karcinomu endometria v České republice, přepočten na 100 000 žen

Česká republika	34
EU (EU-27)	22,5
USA	25,4

Tabulka č.2: Srovnání mortality v České republice, v zemích EU a v USA, přepočten na 100 000 žen

Česká republika	6,8
EU (EU-27)	5,2
USA	4,7

Incidence v České republice vzrostla z původních 21,1/100 000 žen v roce 1975 na 29,1/100 000 v roce 1995 a za dalších 19 let pak již dosáhla hodnoty 34,1/100 000 žen (v roce 2014) (tabulka 3, graf 3).

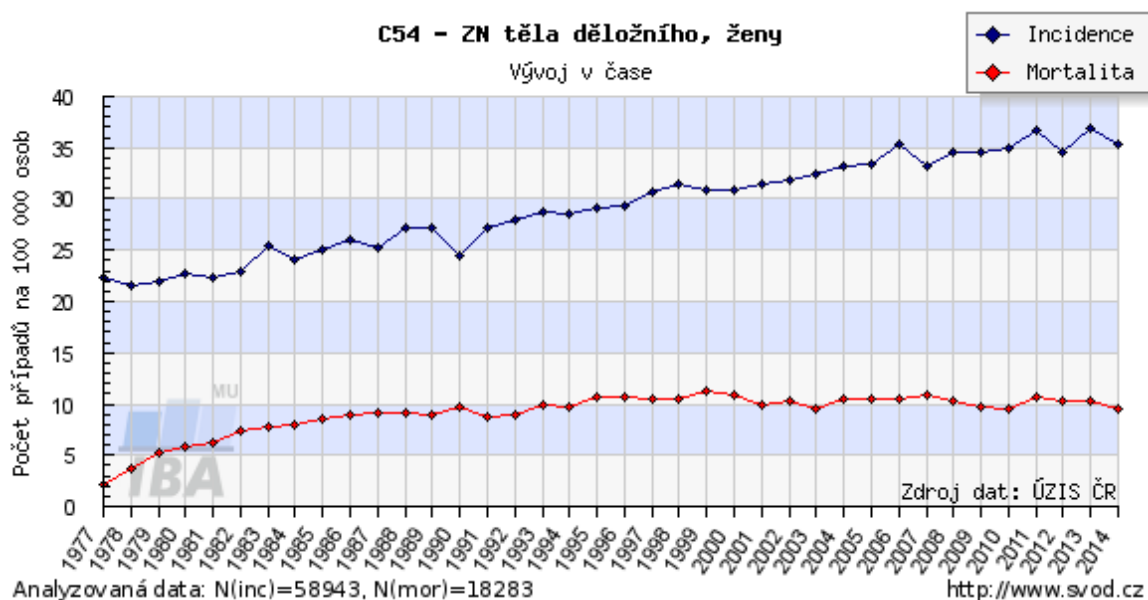
Jediným pozitivním trendem je, že mortalita v souvislosti s karcinomem endometria od roku 2000 stagnuje. Svého maxima 11,3/100 000 žen dosáhla roku 1999 [5, 6].

Tabulka č.3: Vývoj incidence a mortality v České republice od roku 1977
(zdroj: www.svod.cz)

C54 - ZN těla děložního, ženy
Časový vývoj, Počet případů na 100 000 osob

Rok	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	
Incidence	22.31	21.52	21.97	22.78	22.31	22.84	25.37	24.01	25.12	26.1	25.31	27.21	27.13	24.39	
Mortalita	2.13	3.78	5.25	5.87	6.18	7.41	7.82	7.95	8.61	8.91	9.07	9.11	8.95	9.63	
Rok	1991	1992	1993	1994	1995	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	
Incidence	27.2	27.9	28.66	28.58	29.11	27.2	27.9	28.66	28.58	29.11	29.28	30.66	31.43	30.78	
Mortalita	8.67	8.91	9.96	9.69	10.7	8.67	8.91	9.96	9.69	10.7	10.62	10.54	10.52	11.31	
Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Incidence	30.82	31.48	31.91	32.48	33.24	33.42	35.29	33.18	34.63	34.64	35.04	36.66	34.55	36.96	35.33
Mortalita	10.79	9.95	10.31	9.55	10.49	10.41	10.56	10.92	10.23	9.7	9.52	10.59	10.38	10.34	9.47

Graf č.3: Vývoj incidence a mortality v České republice od roku 1977 (zdroj: www.svod.cz)



Karcinom endometria se typicky objevuje u žen v peri- a postmenopauze, diagnóza je stanovena v průměrném věku 63 let, z toho více než 90% případů je diagnostikováno u žen ve věku > 50 let. Přesto postihuje zhruba 4% žen mladších 40-ti let [7].

1.2 Rizikové faktory karcinomu endometria

Dnes převládají názory, že typ I (endometroidní) a typ II (non-endometroidní) karcinomu endometria mají rozdílné rizikové faktory. Rozsáhlá epidemiologická studie publikovaná roku 2013 [8] však na zkoumaném souboru 14 069 případů karcinomu endometria ukazuje, že oba histologické typy mají mnoho společných etiologických faktorů. Těmi nejdůležitějšími jsou: obezita, parita, užívání hormonálních kontraceptiv, kouření cigaret, věk, menarche a diabetes melitus. Naopak vyšší hodnota BMI ovlivňuje významněji více vznik EC I. typu. Autoři této rozsáhlé epidemiologické studie (v souladu s těmito zjištěními) vyslovili závěr, že v i případě typu II karcinomu endometria mohou estrogény hrát svou roli v etiologii vzniku tohoto onemocnění [9]. Dalšími rizikovými faktory zejména pro typ I EC jsou hypertenze, anovulační cykly, léčba neoponovanými estrogény, polycystická ovaria a léčba tamoxifenem [10].

Familiární výskyt karcinomu endometria je v současné době poměrně dobře literárně dokumentován a je všeobecně přijímán fakt, že zhruba 5 % případů karcinomů endometria je podmíněno dědičně. Lynchův syndrom, známý též jako HNPCC – Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma, je příčinou většiny dědičných případů [11]. Jedná se o dědičné autozomálně dominantní onemocnění projevující se vznikem mnohačetných zhoubných nádorů. Objevuje se v mladém a středním věku a kromě dělohy postihuje zejména sliznice tlustého střeva a mazové žlázy v kůži. Ženy s Lynchovým syndromem mají 27-71 % riziko onemocnění karcinomem endometria a přibližně 3-13 % riziko onemocnění karcinomem vaječníků [12].

Současné výzkumy se zabývají též studiem vlivu potravin a stavu výživy na riziko vzniku karcinomu endometria. Hledají též látky, které by ženy před vznikem EC ochraňovaly. Studie publikovaná v roce 2011 prokázala, že vysoký příjem folátů a vitamínů skupiny B (zejména z vitamínových doplňků) je spojen s prokazatelně zvýšeným rizikem vzniku karcinomu endometria, typ II [10].

1.3 Protektivní faktory karcinomu endometria

Z hlediska ochrany endometria před rozvojem maligního onemocnění je diskutován pozitivní vliv délky laktací a počtu gravidit. Během gravidity a při kojení dochází k významnému snížení hladin hypofyzárních a ovariálních hormonů a tím je utlumena stimulace endometria estrogény [13, 14]. V rozsáhlé metaanalytické studii z roku 2015 byl prokázán snížený výskyt karcinomu endometria u žen, které dlouhodobě kojily [15].

Užívání kombinované hormonální antikoncepce (COC) či inzerce nitroděložního systému (IUS) s progestinem omezují vznik hyperplázie endometria. Bylo prokázáno snížení rizika rakoviny endometria přibližně o 50 % při užívání kombinované hormonální antikoncepce. Dle většiny studií, zkoumajících vliv COC na výskyt karcinomu endometria, přetrvával tento ochranný účinek po dobu až 20 let po ukončení užívání COC [16]. Protektivní vliv je dále přisuzován stravě bohaté na ovoce, zeleninu a vlákninu [3]. Též konzumace kávy s obsahem kofeinu (neplatí pro dekofeinovanou kávu) snižuje incidenci I. typu karcinomu endometria [17].

1.4 Klinické projevy

Přestože dosud neexistují spolehlivé screeningové markery, karcinom endometria je obvykle diagnostikován ve svých raných stádiích. Nepravidelné děložní krvácení je přítomno v 90 % případů a obzvláště u postmenopauzálních žen by mělo být považováno za suspektní příznak z malignity [18]. Ostatní symptomy (včetně bolesti břicha apod.) jsou méně časté a jsou většinou příznakem pokročilejšího stadia onemocnění.

1.5 Diagnostika, vyšetřovací metody

Při klinickém podezření na karcinom endometria je diagnóza získána pomocí biopsie endometria. V případě potvrzení diagnózy karcinomu endometria jsou doplněna další vyšetření k detekci šíření nemoci. Magnetická rezonance je již dlouho velmi cennou diagnostickou metodou pro preoperační staging karcinomu endometria [19]. Pro posouzení postižení cervixu a hloubky myometrální invaze je vhodnější použití magnetické rezonance s kontrastní látkou než běžné magnetické rezonance či sonografie nebo počítačové tomografie [19, 20]. Přesto některé práce uznávají vaginální sonografii jako levnější a operativnější alternativu magnetické rezonance k posouzení hloubky invaze do myometria [21] s podobnou mírou přesnosti. Vaginální sonografie je ale daleko více závislá na zkušenosti vyšetřujícího než magnetická rezonance [22]. Počítačová tomografie (abdominální sken) je indikována v případě podezření na šíření mimo malou pánev a zejména pak u nízcce diferencovaných tumorů typu II.

2. Prognostické faktory karcinomu endometria

Přibližně 75 % všech případů karcinomu endometria je diagnostikováno ve stadiu, kdy je nádor ohraničen na děložní tělo [2, 23]. Přesto 15-20 % případů po primární chirurgické léčbě recidivuje do 3 let od léčby a jsou často rezistentní na systémovou léčbu. Proto je snahou dále vylepšit diagnostické a léčebné algoritmy a identifikovat nové markery, aby bylo možné rizikovou skupinu pacientů s časným metastázováním a rizikem recidiv včas identifikovat a aplikovat radikálnější léčebné režimy. Naopak je důležité vyčlenit skupinu pacientů s nízkým rizikem, kde radikální operační léčba nejenže nepřináší léčebný benefit pro pacienty, ale navíc je zatěžuje zvýšenou morbiditou.

Základním (avšak ne příliš přesným) rozdělením pacientů s karcinomem endometria s ohledem na riziko recidivy je dáno histologickým podtypem. Ve většině případů karcinomu endometria typ I – endometroidní se jedná o dobře diferencovaný, ohraničený nádor obvykle spojený s dobrou prognózou. Naopak typ II je charakteristický nízkým grade, rychlým šířením a horší prognózou. Prognostická hodnota tohoto členění je ale velmi limitována, protože bylo prokázáno, že až 20 % EC typ I může recidivovat a naopak přibližně jedna polovina karcinomů typ II zůstává bez recidiv [8, 24] (tabulka 4).

Na základě histologického vyšetření biopsie endometria a hloubky invaze do myometria je možné preoperačně pacienty rozdělit do skupin dle míry rizika. Nízké riziko představují nádory typ I, grade 1 nebo 2 a s infiltrací myometria méně než 50 %. Skupina se středním rizikem je charakterizována nádorem endometroidního typu, grade 3 a s infiltrací myometria do 50 %, či grade 1 nebo 2 a s postižením více než 50 % hloubky myometria. Vysoké riziko pak představují všechny histologicky non-endometroidní typy nádoru s hlubokou invazí do myometria a grade 3 [25-27]. Hloubka infiltrace myometria hodnocená hrubou inspekcí má bohužel nízkou prediktivní hodnotu zejména v případě high grade tumorů [28]. Frozen section provedená peroperačně nadále přesnost diagnostiky zvyšuje [29, 30].

Nález pozitivních lymfatických uzlin během primární operace může identifikovat skupinu pacientů s horší prognózou [27, 31], avšak tento postup je zatížen vyšším výskytem komplikací [32]. Z tohoto důvodu rutinní sampling lymfatických uzlin, zvláště pokud je prováděn laparotomickou cestou, nebyl uznán jako metoda zvyšující benefit pro pacienty [32, 33]. Proto je i nadále snaha najít nové prognostické markery, které by nám umožnily preoperačně identifikovat rizikové pacienty a pro ně pak individualizovat léčbu.

Definitivní zařazení do rizikových skupin, které určují též prognózu, je provedeno podle histologické vyšetření vzorku z hysterektomie, histologického typu, nádoru, grade,

hloubky invaze do myometria, míry postižení cervixu a metastatického šíření [2, 8, 31]. Chirurgický staging karcinomu endometria je od roku 1988 prováděn dle FIGO klasifikace, která byla revidována roku 2009. TNM kategorie jsou definovány tak, že odpovídají stádiím podle klasifikace FIGO. Nízké riziko odpovídá dle FIGO IA-G1, G2, středního riziko: FIGO IA-G3; IB-G1, G2; FIGO II-G1, vysoké riziko: jiný histologický typ než endometroidní karcinom; FIGO IB-G3; FIGO II-G3, extrauterinní šíření, postižení uzlin.

3. Histopatologické charakteristiky

Karcinom endometria je standardně dělen dle histologie na typ I a typ II. Typ I je zodpovědný za 80-90% všech případů karcinomu endometria, histologicky se jedná o endometroidní typ (tj. adenosquamózní, mucinózní a glandulární). Typ II reprezentuje 10-20 % všech případů a jedná se o serózně papilární typ, či o karcinom z jasných buněk [34]. Jednotlivé histologické typy se liší též svými klinickými projevy. Téměř 80 % karcinomů endometria, typ I je diagnostikováno ve stadiu ještě ohraničeném na tělo děložní [18], zatímco u jasnobuněčného karcinomu je to jen v 50% případů [31] a u serózně papilárního typu dokonce jen v 37% případů [31]. Podobně je též i doba přežití v úzké souvislosti s histologickým podtypem nádoru. V případě obou typů je celková doba přežití cca 80 % a interval 5 let bez remise kolem 85 % [18, 34]. V kalkulaci na pouze typ II EC pak celková doba přežití klesá na 36-46 % a interval 5 let bez remise na 45-55 % [31, 35] (tabulka 4).

4. Molekulární patogeneze karcinomu endometria

4.1 Onkogeny a tumor supresorové geny

V procesu kancerogeneze endometriálního karcinomu se uplatňuje několik různých genů. Jsou to tzv. onkogeny a tumorsupresory.

Onkogeny byly objeveny v roce 1911, kdy Rous popsal přenosný sarkom u kuřat. Onkogeny jsou všeobecně geny, které způsobují nebo podporují nádorovou transformaci. Onkogeny mohou být původu virového a dále mohou vznikat mutací naprosto normálních genů, tzv. protoonkogenů. Onkogen z protoonkogenu může vzniknout několika způsoby a to delecí, mutací, translokací či zesílením exprese daného genu nebo jeho genovou duplikací [36]. Následkem těchto změn může v konečném důsledku dojít až ke stimulaci

nádorového růstu. V endometriální kancerogenezi jsou nejvýznamnějšími onkogeny především KRAS a c-erbB-2.

Tumor supresorové geny (též antionkogeny) fungují jako tzv. „pojistky“, které regulují buněčné dělení a v případě abnormální proliferace či poškození genetické informace buněčný cyklus zastaví. Na rozdíl od onkogenů proteiny kódované tumorsupresory mají antiproliferační účinek, podporují diferenciaci a apoptózu. Při poruše těchto genů buňka uniká kontrolním mechanismům, hromadí se sekundární mutace protoonkogenů či tumorsupresorů, což může mít za následek maligní zvrát buňky. Na rozdíl od onkogenů mají mutace v tumor supresorových genech recesivní charakter. To znamená, že k inaktivaci tumor supresorového genu dochází až v případě mutace obou alel. Tento jev popsal poprvé Knudson [37] jako „teorii dvojího zásahu“ (two hit theory) u retinoblastomu. Mutací či inaktivací pouze jedné alely nedochází k iniciaci nádorového procesu. Dojde-li však k mutaci obou alel, je tumor supresorový gen inaktivován a může dojít ke spuštění nádorového procesu. Tento proces byl nazván jako ztráta heterozygoty (LOH – loss of heterozygoty). V případě endometriálního karcinomu byly prokázány především mutace p53, PTEN, CTNNB, CDKN1A(p21) a CDKN2A(p16).

4.2 Molekulární biologie a histologické podtypy karcinomu endometria

Molekulární základ jednotlivých typů karcinomu endometria je jen zčásti probádán. Jednotlivé histologické typy karcinomu endometria se liší též typem genetické abnormality. Typ I je všeobecně spojen s hyperestrogenním prostředím, velmi často obsahuje estrogenové i progesteronové receptory, je diploidní, vykazuje mikrosatelitovou nestabilitu a genové mutace KRAS či PTEN. Typ II karcinomu endometria je velmi často aneuploidní, častými alteracemi jsou mutace tumor supresorového genu CDKN2A či TP53 anebo onkogenu ERBB2 [38, 39].

V současné době je nejčastější genetickou poruchou ve vztahu ke karcinomu endometria popisována mutace tumor supresorového genu PTEN, která je přítomna až v 83 % případů [40]. Inaktivace PTEN je dávana do souvislosti s časnou kancerogenezí [41] a s abnormální proliferací v prostředí bohatém na estrogény [42]. Naproti tomu progesteron navozuje involuci buněk s mutací genu PTEN [42]. Dějem zodpovědným za spuštění kancerogeneze je inaktivace genů mismatch repair systému, která se sporadicky objevuje u 15-20 % karcinomů endometria typ I a současně je hlavním etiologickým faktorem dědičného přenosu EC [11]. Dalšími genetickými změnami v souvislosti s typem I EC jsou mutace β 1-catein genu, KRAS a CTNNB [43, 44]. U typu II karcinomu endometria je pak nejčastější mutace genu p53 [45] a dále pak inaktivace tumor supresorového genu p16 (CDKN2A) či nadměrná exprese onkogenu ERBB

[46, 47]. Nejčastější genetické mutace ve vztahu ke karcinomu endometria jsou uvedeny dále (tabulka 5). Tyto molekulární poruchy mají svůj význam pro prognózu nádorového onemocnění [48], dosud se však nestaly základem pro individualizaci léčby a bohužel ani nezvyšují její úspěšnost [2]. I proto je jejich význam a souvislost s onemocněním karcinomem endometria nadále extenzivně studován.

Přítomnost aneuploidie je u karcinomu endometria všeobecně spojována se špatnou prognózou [49, 50].

Pozitivita hormonálních receptorů ovlivňuje výběr léčby u metastatických typů nádoru, avšak nejagresivnější typy nádorů tyto receptory neobsahují [2]. Korelace positivity receptorů a délky přežití byla potvrzena několika studiemi [51-53].

Tabulka 4: Charakteristiky jednotlivých typů karcinomu endometria

	Karcinom endometria – Typ I	Karcinom endometria – Typ II
Typ	Endometriální	Non-endometriální
Výskyt (rizikové faktory)	Perimenopauzálně Chronická estrogenní stimulace Anovulační cykly Obezita Hypertenze Diabetes melitus	Věk více než 65 let Bez estrogenní stimulace Atrofické endometrium
Incidence	80 % případů EC	20 % případů EC
Iniciální změna	Endometriální intraepiteliální neoplazie Atopická hyperplázie	Endometriální intraepiteliální karcinom
Cesta šíření	Infiltrace myometria Lymfatickými žilami	Hluboká infiltrace myometria Lymfatickými žilami
Agresivita onemocnění	Stabilní pomalý růst 5-ti leté přežití = 80-85%	Agresivní růst Peritoneální metastázy, metastázy v lymfatických uzlinách 5-ti leté přežití = 30-70%
Grade	Low grade, dobrá prognóza	High grade, špatná prognóza
Receptory	ER+, PR+	ER-, PR-
Molekulární poruchy	PTEN (40-80%) KRAS (20-35%) Mikrosatelitová instabilita (20-40%) PIK3CA Beta-catenin (30-40%) TP53 (5-10%) E-catherin (10-15%) P16 (10%)	Mikrosatelitová instabilita (do 5%) PTEN (10%) KRAS (do 5%) TP53 (90%) Beta-catenin (do 5%) E-catherin (80-90%) P16 (40%)

Tabulka 5: Genetické mutace a jejich zastoupení u jednotlivých typů karcinomu endometria

název	funkce	Typ I (%)	Typ II (%)
KRAS [43]	onkogen	13-26	0-10
ERBB2/HER-2/neu [54]	onkogen	ojediněle	18-80
PIK3CA [55]	onkogen	26-36	26-36
PIK3CA [24]	onkogen	2-14	46
Stathmin [24]	onkoprotein	15	64
FGFR2 [56]	onkogen	12	12
PTEN [57, 58]	tumor supresorový gen	35-55	0-11
TP53 [59]	tumor supresorový gen	5-10	80-90
P16 [60, 61]	tumor supresorový gen	10	10-40
MSI [62, 63]	DNA repair	20-45	0-5
MLHI [64]	DNA repair	20-35	0-10
ER, PR [51]	transkripční faktor	70-73	19-24
Beta-catenin [65, 66]	onkogen	25-38	0-5
E-cadherin [67]	tumor supresorový gen	22-43	57-75
EZH2 [68]	transkripční faktor	16	36

MSI = mikrosatelitová instabilita

5. Sérové markery karcinomu endometria

Nádorové biomarkery jsou definovány jako skupina molekul, které jsou přítomny v lidských tkáních, krvi či tělesných tekutinách. Tato skupina zahrnuje jednak geny a chromozomy (uvedeny v kapitole 3.2) a dále pak tzv. markery sérové. Podobně jako i u jiných typů nádorů, tak i v případě karcinomu endometria, je dosud hlavním nedostatkem těchto markerů jejich nízká specifita. Mírně zvýšené hladiny biomarkerů nacházíme např. u zánětu či u řady dalších nemaligních onemocnění. Naopak vysoké hladiny těchto markerů mohou signalizovat přítomnost malignity.

5.1 Ca125

Ca125 je běžně užívaným sérovým markerem jako součást diagnostiky a léčby karcinomu endometria. Určení jeho hladiny před léčbou umožňuje upřesnit staging. Klinicky významné se jeví sérové koncentrace Ca125 vyšší než 35 U/ml [69-71]. Přesto senzitivita (zejména v případě nízkých stadií karcinomu endometria) a i specificita tohoto markeru jsou velmi nízké. Pouze 10-20 % raných stadií karcinomu endometria koreluje se zvýšenými sérovými koncentracemi Ca125. Zvýšené hladiny Ca125 se běžně vyskytují např. u endometriozy, benigních leiomyomů a řady zánětlivých onemocnění. Z tohoto důvodu je tento biomarker v klinické praxi používán především v diagnostice pokročilých stadií [72, 73]. Přesto vysoké koncentrace Ca125 stanovené preoperačně jsou prediktivním faktorem špatné prognózy [74, 75]. Zvýšené hladiny Ca125 mohou signalizovat možné postižení regionálních lymfatických uzlin [76].

5.2 HE4

„Human epididymis protein“ (HE4) je potencionální biomarker v diagnostice karcinomu ovaria. Zvýšené hodnoty jsou ovšem pozorovány i v případě endometriálního karcinomu. Sérové hladiny HE4 mají vyšší senzitivitu než Ca125 a to zejména v časných stadiích karcinomu endometria [77]. Dále bylo prokázáno, že koncentrace HE4 v séru koreluje s hloubkou invaze do myometria a stadiem tohoto onemocnění [78] [79-82]. Byl popsán též statisticky významný vztah mezi sérovými koncentracemi HE4 a metastazováním, histologickým typem nádoru, věkem a BMI pacienta [82].

Hladiny HE4 mají též prognostický význam pro celkovou míru přežití pacientů s karcinomem endometria [83]. Stanovení hladin Ca125 a HE4 současně má vyšší prediktivní hodnotu než v případech, kdy jsou jednotlivé koncentrace těchto markerů posuzovány individuálně [82].

5.3 Ca15.3

Klinický význam stanovení sérových hladin Ca15.3 u pacientů s karcinomem endometria je nízký. Udává se výskyt elevace sérových hladin u 24-53 % pacientů s endometriálním karcinomem. Je též popisován vztah mezi vyššími koncentracemi Ca15.3 (>30U/ml a >50U/ml) a kratší dobou přežití [84].

5.4 VEGF

Neovaskularizace je zásadní děj pro rozvoj růstu nádoru a vznik metastáz. Nejvýznamnějším angiogenetickým faktorem je rodina vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). VEGF hrají zásadní roli v iniciaci jak fyziologické, tak i patologické angiogeneze lymfatických i krevních cév, ovlivňuje cévní permeabilitu. V případě nádorové neovaskularizace je spouštěcím dějem hypoxie, která vyvolá nadměrné uvolňování aktivátorů angiogeneze. Kromě nádorových onemocnění se však vysoké koncentrace VEGF v séru nachází i v případě zánětlivých stavů včetně autoimunitních nemocí.

Přibývá klinických i experimentálních důkazů, že angiogenetické růstové faktory hrají významnou roli i v případě růstu a šíření karcinomu endometria. Byl prokázán vztah mezi sérovou koncentrací VEGF a klinickým stadiem karcinomu endometria [85]. Nadměrná exprese VEGF a jeho receptorů (VEGFR) je též dávána do souvislosti se špatnou prognózou endometriálních karcinomů [85]. Hladiny VEGF a VEGFR-1 mohou být použity jako prediktivní marker pětiletého přežití u pacientů s endometroidním karcinomem [86].

Kamat et al prokazují ve své práci 19x vyšší riziko úmrtí ve skupinách nemocných s vysokou koncentrací VEGF oproti skupinám s nízkou koncentrací v séru [86]. Naopak Fine et al nezachytili výraznější vztah mezi expresí VEGF a stupněm metastazování, recidivami či délkou přežití pacientů s karcinomem endometria [87].

5.5 PLGF

Dalším aktivátorem angiogeneze s možným vztahem ke karcinomu endometria a patřící do rodiny VEGF je placentární růstový faktor (PLGF). Jeho význam byl zkoumán ve vztahu k mnoha typům malignit, včetně karcinomu prsu či kolorektálního karcinomu [88, 89]. V případě karcinomu endometria nebyla dosud role PLGF dostatečně prozkoumána. Zvýšené sérové koncentrace byly prokázány pouze u 4. stadia a současně nebyl vliv hladiny PLGF na délku přežití pacientů [90].

5.6 YKL-40

Biomarker YKL-40, známý také jako chitinase-3-like 1 protein (CHI3L1), byl objeven počátkem 90. let. Jedná se o glykoprotein inhibující apoptózu, je aktivátorem angiogeneze a patří také do rodiny VEGF. U pacientů s revmatoidní artritidou je produkován chondrocyty a buňkami synovie a následně uvolňován do krve. Zvýšené koncentrace tohoto biomarkeru v séru byly identifikovány u pacientů s různými typy nádorů. Existuje řada studií, které prokázaly

prognostickou hodnotu YKL-40 zejména v případě melanomu, rakoviny prsu, plic, kolorektálního karcinomu či rakoviny vaječníků a endometria [91-95] [96].

I v případech karcinomu endometria FIGO I-IB byly prokázány vyšší hladiny markeru YKL-40, což naznačuje jeho potenciální využitelnost jako biomarkeru vhodného k detekci časných stadií tohoto onemocnění. Koncentrace YKL-40 mají vyšší diagnostickou senzitivitu u karcinomu endometria I a II ve srovnání s Ca125. Pacienti se zvýšenou hladinou YKL-40 před léčbou mají též vyšší riziko relapsu [97].

5.7 AMH

AMH, neboli antimülleriánský hormon. U žen je AMH produkován buňkami granulózy rostoucích foliklů a je pokládán za senzitivní marker ovariální rezervy. Jeho koncentrace jsou velmi nízké po narození, významně rostou v pubertě. Tyto vysoké hodnoty přervávají zhruba do 25 let věku žen a poté postupně klesají až na téměř nedetekovatelné hladiny v období menopauzy [98]. AMH je též využíván jako prediktivní marker ovariální odpovědi na IVF léčbu [99]. Diskutován je též jeho diagnostickým význam v případě pacientek s PCO syndromem, kde u těchto pacientek bývají jeho sérové hladiny dvojnásobně zvýšeny v porovnání se skupinou zdravých žen [100]. Klinický význam monitorování sérových koncentrací AMH je dobře dokumentován u ovariálních „granulosa cell“ tumorů. Až 90% těchto nádorů vykazuje velmi vysoké hodnoty AMH v krvi [101].

Antimülleriánský hormon vazbou na jeho specifický receptor typu II (AMHRII) inhibuje buněčnou diferenciaci a růst. Experimentální studie prokázaly, že AMH inhibuje růst rakoviny endometria apoptózou a zástavou buněčného cyklu v endometriu pozitivním na AMHRII. Podobný efekt AMH byl popsán i v případě endometriózy [102].

Bylo publikováno jen minimum prospektivních epidemiologických údajů o vztahu AMH a riziku rakoviny endometria. Většina poznatků se opírá o experimentální data, která předpokládají, že vyšší cirkulující hladiny AMH mohou poskytnout relativní ochranu proti vývoji rakoviny endometria. Fortner et al ve svém výzkumu neprokázal asociaci mezi koncentrací AMH a rizikem karcinomu endometria [103]

5.8 DJ-1

DJ-1, známý též pod názvem protein 7 Parkinsonovy choroby (PARK7). Jedná se o protein s mnoha funkcemi. Kromě jeho hlavní úlohy při podpoře buněčné proliferace a regulace buněčného cyklu byla přítomnost DJ-1 prokázána u mnoha typů rakoviny včetně karcinomu

prsu [104, 105]. Dále byla demonstrována role DJ-1 jako onkogenu modulujícího PTEN a tím podporujícího přežívání buněk [106]. Shu et al prokázali zvýšenou expresi DJ-1 ve vzorcích tkáně karcinomu endometria oproti endometriu fyziologickému. Vysoké hladiny DJ-1 jsou spojovány též s progresí endometriálního karcinomu [107].

6. Další potenciální sérové markery

6.1 S100-A11

Jedná se o skupinu proteinů, u kterých se předpokládá podíl na rozvoji kancerogeneze a progresi rakovinných onemocnění. S100 jsou malé proteiny vážící kalcium a vyskytující se výlučně u obratlovců. První protein z této skupiny byl objeven v roce 1965 [108]. Název S100 vznikl na základě jejich rozpustnosti ve 100 % nasyceném sulfátu amonném při neutrálním pH. V lidské populaci bylo dosud popsáno 25 zástupců této skupiny. Proteiny S100A1 – S100A18 jsou kódovány geny v okolí lokusu 1q21 (známý též jako epidermální diferenciací komplex). Další skupina S100B, S100P, S100Z a S100G jsou kódovány na lokusu 21q22, 4p16, 5q14 and Xp22 [109]. Proteiny S100 se vyskytují jako homo-, hetero- či oligodimery. Předpokládá se, že každý S100 protein v organismu zastává různé funkce [110]. Díky svému intra- a extracelulárnímu působení ovlivňují řadu různých biologických procesů, jako například regulaci buněčného cyklu, buněčného růstu, diferenciaci a motilitu buněk [111-113]. Intracelulární funkce zahrnují regulaci fosforylace, transkripčních faktorů, cytoskeletálních komponent a udržování homeostázy vápníku. Extracelulárně působí mechanismem podobným cytokinům na receptory pro produkty pokročilé glykace (RAGE) [114].

Asociaci mezi proteiny S100 a rozvojem rakoviny lze vysvětlit několika způsoby. Především jde o náchylnost lokusu 1q21 (kde je většina S100 genů lokalizována) ke genetickým mutacím, což pravděpodobně podporuje rozvoj kancerogeneze [115]. Proteiny S100 vykazují pozměněné hladiny exprese v rakovinových buňkách ve srovnání s normálními buňkami a jsou různě exprimovány v různých malignitách podle typů a stadií [116-122].

Bylo též prokázáno, že ovlivňují a regulují různé proteiny, které se podílejí na rozvoji nádorového bujení a mají různé účinky na aktivitu p53 [123-127]. Význam jednotlivých proteinů ze skupiny S100 je zkoumán ve vztahu k četným typům nádorů. Calgizzarin (S100-A11) je považován za možný sérový marker karcinomu endometria [128]. Nadměrná exprese proteinů ze skupiny S100 byla detekována u malobuněčného karcinomu plic a děložních leiomyomů [129, 130]. Bylo prokázáno, že calgizzarin (S100-A11) blokuje apoptózu

v buňkách děložního leiomyosarkomu [129]. Zdá se, že svou úlohu hraje i v případě karcinomu prsu [131].

6.2 AIF-1

Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) je cytoplazmatický, „calcium-binding“ protein, který má významnou úlohu v rozvoji zánětlivé reakce jako odpovědi na tkáňové trauma.

Tento faktor byl poprvé objeven v roce 1995 u krysy a o rok později i u lidí. Jedná se o protein produkováný aktivovanými makrofágy, který byl izolován z transplantovaných srdečních štěpů, které se nevhodily [132, 133]. Ještě dva roky před objevem AIF-1 byl ze střev prasat izolován tzv. „daintain“ protein, která má vliv na sekreci insulinu a je též produkován aktivovanými makrofágy [134]. Daintain a AIF-1 jsou v podstatě identické peptidy, liší se pouze zastoupením jednotlivých aminokyselin [135]. Dalšími strukturálně podobnými faktory jsou Iba1 [136] a MRF-1 (microglia response factor) [137].

U lidí je AIF-1 gen kódován v okolí lokusu chromozomu 6p21.3, který je v těsné blízkosti genů regulujících tvorbu peptidů zodpovědných za zánětlivou odpověď organismu, jako jsou např. TNF alfa a beta (tumor necrosis factor), NF- κ B (nuclear factor) či proteiny komplementu [138, 139]. V lidském těle byl AIF-1 ve významném množství prokázán v lymfatické tkáni [140], v zárodečných buňkách varlete a dále zejména v červené pulpě sleziny [141]. AIF-1 má všeobecně prozánětlivý efekt. Spolu s makrofágy hraje zásadní roli v rozvoji zánětlivé a imunitní reakce jako odpovědi na tkáňové trauma. Makrofágy vlivem působení AIF-1 jednak mění svůj tvar a dále produkují velké množství interleukinu IL-6, IL-10 a IL-12p40 [142]. Při pokusech in vivo bylo dále prokázáno, že AIF-1 vyvolává oxidační stres, zvyšuje hladinu C reaktivního proteinu a aktivací fibrinogenu zvyšuje krevní koagulaci [143, 144]. Je tedy zřejmé, že AIF-1 jako spouštěč zánětlivé reakce je významným faktorem v rozvoji onemocnění jako jsou autoimunitní choroby, rejekce štěpu po transplantaci, zánětlivá onemocnění CNS, vaskulopatie či nádorová onemocnění. Recentní studie odhalily, že AIF-1 je uvolňován do krevního řečiště během experimentálně navozené autoimunitní neuritidy [145]. Byla prokázána významná korelace mezi expresí AIF-1 v buňkách makrofágů a glie v případě maligních gliomů u lidí [146]. AIF-1 je rovněž přítomen ve stěně cév dětských hemangiomů. Přítomnost AIF-1 byla prokázána v endoteliálních buňkách pupečníku, kde zvyšuje jejich proliferaci a migraci. Nález časté exprese AIF-1 v endoteliálních buňkách hemangiomů podporuje významnou roli tohoto faktoru v patofyziologii těchto typů nádorů [147, 148]. Další malignitou, kde byla prokázána významná exprese AIF-1, je duktální karcinom prsu. Pokusy

na myších odhalily pozitivní vliv AIF-1 na růst nádoru [149, 150]. S ohledem na tato zjištění se jeví AIF-1 jako nový slibný marker k detekci či sledování léčebného efektu mnoha zánětlivých a nádorových onemocnění. Je zkoumáno i jeho využití jako markeru pro hodnocení a kontrolu metastazování nádoru v průběhu onkologické léčby.

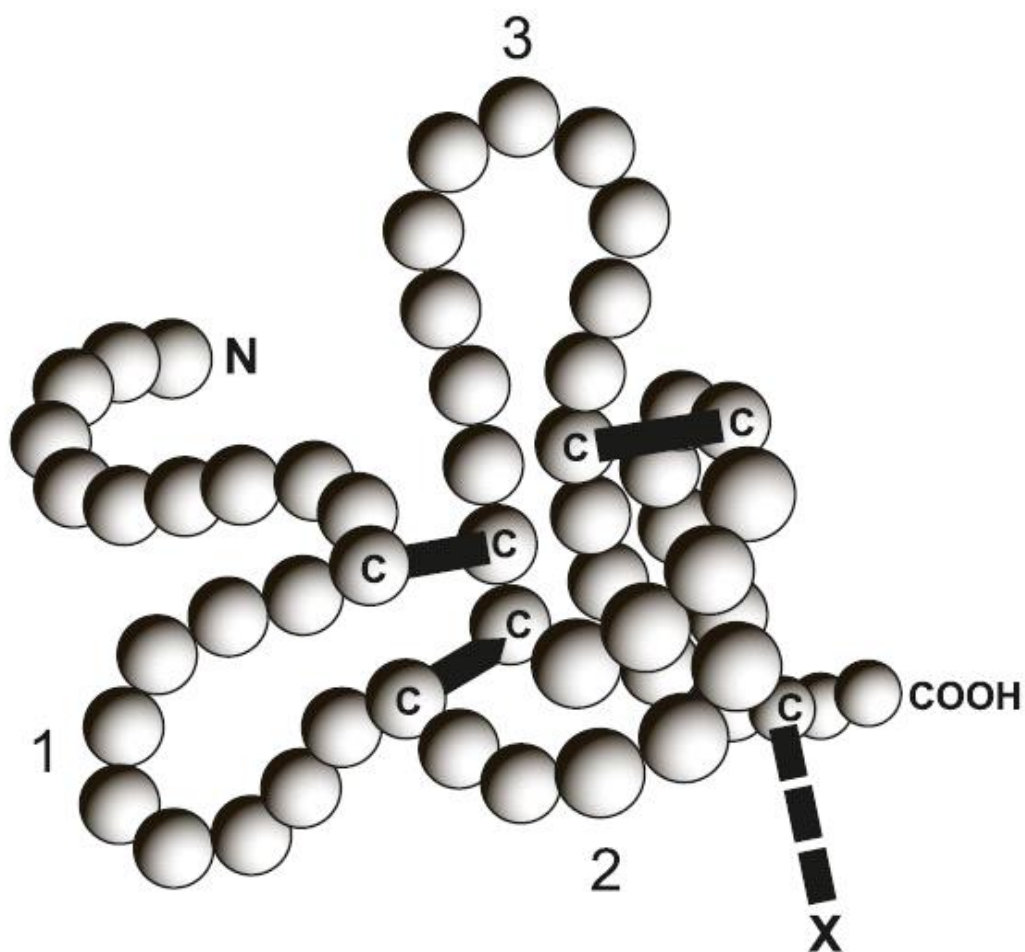
6.3 TFF (trefoil peptidy)

Trefoil peptidy (trifoláty) patří do skupiny malých peptidů bohatých na cystein. Trifolátové proteiny jsou definovány přítomností 42-43 aminokyselin, které tvoří unikátní strukturální motiv. Jejich tři páry disulfidových vazeb jsou zodpovědné za charakteristický vzhled molekuly ve tvaru trojlístku. Jsou zastoupeny v lidském těle a jejich geny jsou umístěny společně na chromozomu 21q22.3 [151].

Z animálních pozorování (myš, krysa, ropucha) je zřejmé, že trifolátová doména je evolučně velmi stabilní [152]. Dosud byly identifikovány tři savčí trefoil peptidy. Jednotlivé trifolátové peptidy se tkáňově specificky vyskytují v epiteliálních buňkách lidského gastrointestinálního ústrojí: TFF1 v epiteliálních povrchových foveolárních buňkách celého žaludku, TFF2 v distální části žaludku a v dolních částech Brunnerových žlázek duodena a TFF3 v průběhu celé délky tenkého i tlustého střeva [153-157]. Jedná se o velmi stabilní molekuly, rezistentní k účinkům kyselin, proteáz i tepelné degradaci [158, 159].

Jejich fyziologický výskyt byl již dokumentován i v dalších tkáních - hypofýze, hypotalamu, slinných žlázách, v děloze a prsní tkáni [160-163]. U mladých žen se vzorec exprese mění v závislosti na menstruačním cyklu. Naopak, v mukózních epiteliálních buňkách respiračního a močového traktu nebyly dosud identifikovány a je možné, že probíhající výzkumy odhalí další členy této rodiny. Trifoláty by v budoucnu mohly sloužit jako sérové markery nádorových a inflamatorních onemocnění, případně poruch reprodukce.

Obrázek 1: Znáznornění jedné molekuly trifolátového peptidu (TFF). Klíčky odpovídé za název „trifoláty“ jsou očíslovány. Esenciální pro tvar struktury jsou residua cysteinu (C). Pro některé funkce trifolátů je nezbytná dimerizace na místě „X“. Tak vzniká struktura podobná TFF2, obsahující dvě domény trifolátů.



Od začátku svého zkoumání byly trefoil peptidy velmi různorodě pojmenovávány, což bylo někdy zavádějící. Proto byla ve Francii v roce 1996 schválena definitivní nomenklatura a vzniklo doporučení nadále používat pouze názvy TFF1, TFF2 a TFF3 (tabulka 6).

Tabulka 6: Nomenklatura trefoil peptidů

lokus (gen) -starý název	lokus (gen) - nový název	peptid -starý název	peptid - nový název
BCEI	TFF1	pS2 BCEI pNR-2 pNR-105 Md2	TFF1
SMLI	TFF2	Spazmolytický polypeptid	TFF2
-----	TFF3	ITF (intestinal trefoil factor) P1.B	TFF3

Mechanismus působení

Dosud byly identifikovány dvě základní funkce trefoil peptidů v gastrointestinálním traktu – ochrana sliznic a tkáňové hojení. Tyto peptidy jsou považovány za proteiny „okamžité reakce“ na tkáňové poranění, kde ovlivňují časné fáze tkáňového hojení [159]. Kromě toho je možno tyto proteiny detekovat v případě mnoha humánních karcinomů. Trefoil peptidy zlepšují ochranné schopnosti supramukózní bariéry na povrchu sliznic gastrointestinálního traktu interakcí s mucinózními glykoproteiny a vytvořením viskoelastické mukózní gelové vrstvy chránící tyto buňky před působením žaludečních kyselin [164]. Role těchto peptidů je spatřována v indukci změn fyzikálních vlastností mucinu, vedoucí ke zvýšení optické hustoty a viskozity ochranné slizniční vrstvy. Dále se předpokládá jejich vliv na pohárkové buňky, kde ovlivňují sekreci a kvalitu produkovaného mucinu. TFF peptidy jsou též zřejmě vylučovány jako součást mucinu. Provedené studie předpokládají, že TFF peptidy přispívají k ochraně žaludeční sliznice před acidifikací tvorbou silnější ochranné vrstvy mukózního gelu v žaludku [165]. Další práce přisuzují protektivní roli TFF spíše na úrovni působení na receptory. Transport chloridových iontů v gastrointestinálních epitelálních buňkách je při pokusech in vitro indukovan pouze v případě, když bazolaterální povrch buněk je vystaven působení TFF. Navázání TFF3 na membránový protein kolorektálních epitelálních buněk je spojeno s následnou fosforylací tyrosinu a beta-kateinu. Tyto cytoplazmatické peptidy poté ovlivňují receptorovou odpověď [166]. Kromě ochrany sliznic trávicího traktu hrají TFF významnou roli též v procesu hojení již vzniklého poranění. Na mnoha zvířecích modelech ale i lidských buněčných koloniích bylo prokázáno, že trefoil peptidy indukují buněčnou migraci, a tím umožňují rychlou obnovu mukózy po jejím poranění, což je proces zvaný restituce [159, 164]. Zvýšená koncentrace TFF peptidů byla pozorována v případech zánětlivých onemocnění střev a dále pak v blízkosti peptických ulcerací, zejména v epitelálních buňkách migrujících přes bázi vředu [167]. Recentní studie podporují hypotézu významu TFF peptidů ve stimulaci obnovy gastrointestinálních poranění. Při pokusech na myších s nadprodukcí TFF2 byla demonstrována zvýšená rezistence na indometacinem indukované poškození sliznic [168]. Myši s nedostatkem genu pro TFF3 vykazovaly poruchu slizničního hojení a podléhaly důsledkům zánětlivých střevních onemocnění [169]. Stimulací migrace epitelálních buněk z okrajů rány spolu se zplošťováním přiléhajících nepoškozených buněk přispívají tyto peptidy k obnově integrity sliznic [170].

Tabulka 7: Výskyt TFF peptidů v jednotlivých orgánech (PID = pánevní zánětlivé onemocnění, UACL = „ulcer-associated cell lineage“)

Za fyziologických podmínek

Peptid	orgán	
TFF1	žaludek	hlenové buňky
	tenké střevo	buňky vývodů Brunnerových žláz
	tlusté střevo	pohárkové buňky poblíž povrchu krypt
	slinivka břišní	fokálně v ductus pancreaticus
	žlučník	hlenové žlázy rozesté po sliznici
	prsni žláza	epitel lobulárních a duktálních buněk
	prostata	fysiologická tkáň
TFF2	žaludek	fundus; hlenové buňky antra žaludku; hlenové buňky při bázi žláz
	tenké střevo	lalůčky Brunnerových žláz a buňky jejich distálních vývodů
	slinivka břišní	fokálně v ductus pancreaticus
	žlučník	hlenové žlázy rozesté po sliznici
TFF3	tenké střevo	lalůčky Brunnerových žláz a buňky jejich vývodů, pohárové buňky
	tlusté střevo	povrchové pohárové buňky
	žlučník	hlenové žlázy rozesté po sliznici
	hypothalamus	neurony peri- a paraventriculárních jader
	hypofýza	oba laloky
	urogenitální trakt žen	v epitelu

Za patologických podmínek

Peptid	orgán	
TFF1	jícen žaludek tenké střevo tlusté střevo žlučník genitální trakt-ženy ostatní	Barrettův jícen metaplázie, hyperplastické polypy, karcinom metaplázie, chronické ulcerace, UACL UACL, hyperplastické polypy, adenomy, adenokarcinomy karcinom žlučových cest karcinomy: endometria, ovaria (mucinózní>serózní), čípku karcinomy: prsu, slinivky břišní, prostaty, močového měchýře, plic
TFF2	jícen tenké střevo tlusté střevo	Barrettův jícen metaplázie, chronické ulcerace, UACL UACL, hyperplastické polypy, adenomy, adenokarcinomy
TFF3	žaludek tenké střevo tlusté střevo	tkáň přilehlá k ulceracím, metaplázie pohárových buněk chronické ulcerace, UACL, hyperplastické polypy, adenomy, adenokarcinomy (mucinózní)

Vztah k neopláziím

TFF1 byl původně izolován z buněk karcinomu prsu. Od té doby několik studií dokumentovalo vztah mezi TFF peptidy a vznikem neoplázií. Expres TFF1 byla prokázána u mnoha známých epiteliálních karcinomů, včetně karcinomu prsu, žaludku, slinivky, plic, endometria, vaječníku (zejména mucinózní typ), prostaty a dále některých nádorů močového měchýře a hrdla děložního [171, 172]. Rozdílná exprese TFF proteinů u jednotlivých nádorů je nicméně poměrně dobře zdokumentována. U karcinomu prsu, kde je exprese TFF1 přítomna až u 50 % nádorů, je pozitivita na TFF1 spojena se stavem estrogenových receptorů, odpovědí na hormonální léčbu a příznivou prognózu [173, 174]. U všech ostatních tumorů se zdá být přítomnost TFF1 nezávislá na stavu estrogenových receptorů.

Tabulka 8: Výskyt TFF u nádorových onemocnění

	TFF1	TFF2	TFF3
Gastrointestinální trakt	Karcinom žaludku karcinom žlučníku a žlučových cest kolorektální hyperplastické polypy kolorektální karcinom	Karcinom žaludku karcinom žlučníku a žlučových cest kolorektální hyperplastické polypy	Hepatocelulární karcinom kolorektální hyperplastické polypy kolorektální karcinom
Endo- a exokrinní žlázy	karcinom pankreatu karcinom prsu (LCIS, DCIS) karcinom štítné žlázy	karcinom pankreatu	karcinom prsu (LCIS, DCIS)
Urogenitální trakt	karcinom močového měchýře karcinom prostaty karcinom vaječníku karcinom čípku děložního karcinom těla děložního		
Respirační ústrojí	bronchiální karcinom		malobuněčný karcinom plic

Použité zkratky: LCIS – lobulární karcinom in situ

DCIS – duktální karcinom in situ

Dosud není známo, zda TFF peptidy ovlivňují vznik tumoru či jeho metastazování. Možnost detekovat TFF v nádorových tkáních či stanovovat jejich sérovou koncentraci by mohlo být klinicky užitečné.

TFF a karcinom endometria

V nedávných studiích byly prokázány vyšší sérové hladiny TFF3 u pacientek s endometrálním karcinomem G3 ve srovnání se zdravými kontrolami a pacientkami s hyperplazií endometria [175]. Podobně imunohistochemické analýzy ukázaly zvýšenou expresi TFF3 u špatně diferencovaných endometrálních karcinomů [176]. Použití imunohistochemického panelu obsahujícího estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR), insulin-like growth factor II mRNA – binding protein 3 (IMP3) a TFF3 umožňuje bezpečně odlišit vzácné podtypy karcinomů endometria G3 od serosního karcinomu a karcinomu z jasných buněk. Na rozdíl od špatně diferencovaného karcinomu endometria mají přes podobnou histopatologii serosní karcinom a karcinom z jasných buněk významně horší prognózu z hlediska přežití pacientek. Možnost odlišení těchto nádorů pomocí imunomarkerů nabývá na významu zejména v případě, že je tento krok možné učinit již na materiálu získaném z biopsie/kyretáže a následně včas uzpůsobit adekvátní management těchto onemocnění [177].

7. Cíl práce a pracovní hypotéza

V současné době nejsou známy žádné relevantní sérové markery pro karcinom endometria i přesto, že v této oblasti probíhá velmi intenzivní výzkum. Základem léčby karcinomu endometria nadále zůstává chirurgický staging. Nález pozitivních lymfatických uzlin během primární operace může identifikovat skupinu pacientů s horší prognózou, avšak tento postup je zatížen vyšším výskytem komplikací. Proto je i nadále snaha najít nové prognostické markery, které by nám umožnily preoperačně identifikovat pacientky s vysokým nebo naopak zanedbatelným rizikem postižení lymfatických uzlin a pro ně pak individualizovat chirurgickou léčbu.

Cílem naší práce bylo:

- přispět k pochopení endometriální kancerogeneze na úrovni molekulárně genetických změn
- stanovení sérových hladin S 100A11-Calgizzarinu, TFF1, TFF2 a TFF3 a AIF-1 u pacientek v okamžiku chirurgické léčby endometriální hyperplazie a karcinomu endometria
- stanovení sérových hladin S 100A11-Calgizzarinu, TFF1, TFF2 a TFF3 a AIF-1 u pacientek při chirurgické léčbě benigních gynekologických onemocnění, které budou tvořit kontrolní soubor

- zhodnocení korelaci s markery imunitní a zánětlivé odpovědi k vyloučení vlivů patologického nutričního stavu (obezita)
- zhodnocení korelace těchto markerů s tradičními klinicko-patologickými charakteristikami endometriálního karcinomu (věk, klinické stadium onemocnění, histologický grade, hloubka myometrální invaze, postižení lymfatických uzlin)

Pracovní hypotéza

Jak vyplývá ze zpráv v recentní odborné literatuře, jsou studované biomarkery S 100A11-calgirazzinu, TFF a AIF-1 nadějně tumormarkery u řady zhoubných nádorů. Předpokládáme, že tyto markery jsou zvýšeny u patologických stavů endometria. Na základě těchto zjištění by stanovení S 100A11-calgirazzinu, TFF 1-3 a AIF-1 mohly být klinicky dobře využitelné jak pro diagnostiku, tak pro léčbu a monitorování průběhu onemocnění karcinomem endometria.

8. Materiál a metodika

8.1. Charakteristika souborů

Tři prospektivní studie byly provedeny na porodnicko-gynekologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci v období říjen 2012 až červen 2015. Pacientky potvrdily svou účast ve studii podpisem informovaného souhlasu (viz. příloha). Výzkum byl schválen etickou komisí a byl veden v souladu s příslušnými vnitrostátními předpisy a s principy Helsinské deklarace.

Soubor 1- TFF

Do první studované skupiny bylo zařazeno konsekutivně 89 pacientek, které podstoupily hysteroskopii a izolovanou kyretáž pro postmenopauzální krvácení. U 53 pacientek ve věku (průměr±standardní odchylka) 63,4±9,5 (33-80 let) byl histopatologicky z materiálu získaného při kyretáži diagnostikován karcinom endometria, u 6 pacientek ve věku 62,9±6,4 (55-74 let) byla diagnostikována hyperplazie endometria a 30 pacientek ve věku 63,3±9,3 (48-62 let) s histologicky verifikovanou atrofií endometria tvořilo kontrolní soubor. Před operačním výkonem byla každé pacientce odebrána venózní krev a odeslána na laboratorní vyšetření TFF1, TFF2 a TFF3.

Soubor 2 – TFF3, S100-A11, AIF-1

Do druhé studované skupiny bylo postupně zařazeno celkem 232 pacientek. 98 pacientek s histologicky prokázaným karcinomem endometria (průměr±standardní odchylka) 65±10 (33-80 let), které byly plánovány k operační léčbě. Dále do tohoto souboru bylo zařazeno 43 pacientek 63±10 (44-97) s hyperplázií endometria stanovenou histopatologicky z materiálu získaného při kyretáži a hysteroskopii a 91 žen 65±9 (48-87) s negativním hysteroskopickým nálezem a benigním histologickým nálezem endometria. Každé pacientce byla odebrána venózní krev a odeslána na laboratorní vyšetření TFF3, S100-A11 a AIF-1. U 98 pacientek, které byly indikovány k operační léčbě, byl krevní odběr proveden v den operace před započítím chirurgického výkonu.

Soubor 3 - TFF3, S100-A11, AIF-1 a markery zánětlivé odpovědi

Do třetí studované skupiny bylo zařazeno konsektivně 98 pacientek s histologicky prokázaným karcinomem endometria (průměr±standardní odchylka) 65±10 (33-80 let), které podstoupily hysterektomii s oboustrannou adnexektomií, pánevní a paraaortální lymfadenektomií. Operační výkon byl proveden laparotomicky, laparoskopicky či roboticky. Dále 24 pacientek ve věku 55±12 (36-80 let), které se podrobily elektivní hysterektomii pro nemaligní onemocnění. Hysterektomie byla provedena buď otevřenou laparotomickou cestou anebo jako laparoskopicky asistovaná vaginální hysterektomie. Do těchto dvou skupin byly pacientky alokovány náhodně. Každé pacientce byla v den operace před započítím chirurgického výkonu odebrána venózní krev a odeslána na laboratorní vyšetření biomarkerů TFF3, S100-A11, AIF-1 a sérových markerů zánětlivé odpovědi. Zkoumanými sérovými markery zánětlivé odpovědi jsou: leukocyty, trombocyty, C reaktivní protein, IL-6, citrulin, vitamín D, alfa-tokoferol, retinol, kynurenin a tryptofan. Ve stejnou dobu byly odebrány vzorky moči, které byly odeslány k analýze poměru neopterin/kreatinin. K dalším klinickým a laboratorním parametrům, které byly hodnoceny, patřily: věk pacientky, body mass index (BMI), počet získaných lymfatických uzlin, grade, stage a postižení lymfatických uzlin. BMI byl kalkulován použitím standardního vzorce (tělesná hmotnost/výška²).

8.2. Vyšetření vzorků

8.2.1 Vyšetření TFF1-3, S100-A11 a AIF-1 v séru

Metodika stanovení hladin TFF1, TFF2, TFF3, S110-A11 a AIF-1 byla vyvinuta firmou Biovendor (Brno, Česká republika). Všechny parametry byly měřeny při dostatečných analytických charakteristikách; CV <5 %, CV mezi jednotlivými sériemi <8 %; a měření analytických charakteristik bylo dokonalejší, než bylo uvedeno v laboratorním manuálu. Všechna měření byla provedena ve stejném časovém období, na biorobotickém analyzátoru DS2 (Dynex, USA), po centrifugaci (aliquotní sérum, chlazená centrifuga, 4 C, 3500/4 min, zmrazeny).

8.2.2 Vyšetření kynureninu, tryptofanu, neopterinu a kreatininu v séru

Analýzy byly provedeny pomocí vysoce výkonné kapalinová chromatografie (HPLC) Prominence LC 20 Shimadzu (Kyoto, Japonsko) vybavené speciálním automatickým vzorkovačem pro mikrotitrační desky. Vzorky byly připravovány technikou mikrotitračních desek s filtrem AcroPrep 96 filter Plate 0.2 μ m / 350 ul Pall Corporation (Ann Arbor, MI, USA), vakuového potrubí Phenomenex (Aschaffenburg, Německo), vakuového čerpadla VAC Space-50 Chromservis (Praha, Česká republika) a centrifugy Minispin Eppendorf (Hamburk, Německo). Kynurenin a kreatinin byly stanoveny pomocí detekce diodového pole (230 a 235 nm), neopterin a tryptofan byly detekovány za použití fluorescenční detekce (excitace a emise vlnových délek 353 nm a 458 nm pro neopterin, a excitační a emisní vlnové délky 254 nm a 404 nm pro tryptofan).

8.2.3 Vyšetření retinolu a alpha-tokoferolu v séru

Metoda použitá v této studii pro analýzu retinolu a alfa-tokoferolu v séru byla modifikována z metody Urbánek et al [178]. Separace retinolu a alfa-tokoferolu byla provedena s využitím monolitické kolony Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt, Německo). Analýza byla provedena za použití systému Prominence HPLC (Shimadzu) [179].

8.2.4 Vyšetření vitamínu D v séru

Celkem 50 µl 4% sulfátu zinku jako srážecího činidla a 400 µl methanolu bylo přidáno do 200 µl lidského séra v Eppendorfově zkumavce. Po protřepání (20 vteřin) se vzorek inkubuje po dobu 10 minut při teplotě 4 ° C. Dále byl vzorek centrifugován (14 000 x g, 5 min, 21 ° C) a 300 µl supernatantu bylo filtrováno za použití filtračních destiček s průměrem 0,2 µm. Filtrovaný roztok byl vstříkovan do systému UHPLC. Analýza byla provedena s použitím soupravy UHPLC Nexera (Shimadzu) společně s hmotnostním spektrometrem LCMS-8030 triple-kvadrupolem pracující v pozitivním režimu ESI. Chromatografická separace byla provedena na analytické koloně Kinetex C18 (1,7 µm, 3 × 100 mm) připojené k ochranné cartridge C18, obojí zakoupené od Phenomenex (Aschaffenburg, Německo). Data byla zpracována pomocí software LabSolutions 5.41 SP1.

8.2.5 Vyšetření citrulinu v séru

Pro citrulinovou analýzu bylo použito 20 µl séra, které bylo smícháno se 100 µl methanolickeho roztoku obsahujícího 0,1% FA a deuterovanými vnitřními standardy (aminokyseliny a acylkarnitiny, ne-derivatizovaná reagenční souprava; Chromsystems, Mnichov, Německo). Konečné roztoky byly vortexovány a centrifugovány (24 400 x g, 10 min při 24 ° C, 400 x g při 4 ° C) a 80 µl supernatantu bylo přeneseno na devadesátišesti jamkové destičky pro hmotnostní spektrometrickou analýzu s přímým vstříkáním. Zbývající supernatant byl seskupen a použit pro kontrolu kvality [180]. Vzorky byly měřeny přímou hmotnostní spektrometrií (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Data byla zpracována pomocí software Chemoview 2.0 (AB Sciex).

8.2.6 Vyšetření C reaktivního proteinu (CRP) v séru

Hladiny CRP byly stanoveny na analyzáru Cobas 8000 (Hitachi, Japonsko).

8.2.7 Vyšetření interleukinu-6 (IL-6) v séru

Detekce hladiny IL-6 v lidském séru byla provedena elektrochemiluminiscenční imunoanalýzou (ECLIA) za použití Cobas 8000 analyzátoru.

8.2.8 Vyšetření neopterinu v moči

Vzorky moči byly po odběru uchovávány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy. Po centrifugaci (5 min, $1\ 300\times g$) a zředění 100 μl vzorku moči s 1,0 ml mobilní fáze obsahující 2 g disodium-EDTA na litr byly vzorky umístěny do HPLC kolony. Neopterin byl analyzován pomocí vysoce výkonné kapalinové chromatografie (HPLC) Prominence LC20 (Shimadzu). Kreatinin byl stanoven pomocí Jaffeho reakce po předchozím rozředění vzorku 1:50 na modulárním analyzátoru (Roche) s použitím komerční sady podle pokynů výrobce. Koncentrace neopterinu byly vyjádřeny jako poměr neopterinu / kreatininu ($\mu\text{mol} / \text{mol}$ kreatininu).

8.3. Statistické vyhodnocení

Výsledky byly kvantitativně vyhodnoceny jako průměr (mean), medián, směrodatná odchylka (SD), minimální a maximální hodnota. Rozdíly ve věku mezi skupinami byly analyzovány pomocí neparametrického Friedmanova ANOVA testu. Další údaje byly analyzovány pomocí Mann-Whitney testu s Bonferroniho korekcí a Kruskal-Wallisova testu. Hladina statistické významnosti byla stanovena na 5 %.

9. Výsledky

9.1. Hladiny TFF1, TFF2, TFF3 (Metodika: Soubor 1)

Pacientky se z hlediska věku nelišily mezi skupinami s karcinomem, endometrální hyperplázií a kontrolní skupinou. Charakteristika sledovaného souboru a závislost sérových koncentrací trifolátů v jednotlivých skupinách jsou souhrnně uvedeny níže (tabulka 9 a graf 4). Sérové hladiny TFF1 byly ve skupině s karcinomem endometria na úrovni (průměr \pm standardní odchylka) $3,04\pm 3,55$ ng/ml (0,48-20,97), ve skupině s hyperplázií endometria byly $2,15\pm 1,14$ ng/ml (0,96-4,14) a ve skupině kontrolní $2,47\pm 2,23$ ng/ml (0,51-9,52). V sérových hodnotách TFF1 nebyl mezi skupinami statisticky významný rozdíl. Sérové hladiny TFF2 byly ve skupině s karcinomem endometria na úrovni $5,22\pm 4,74$ ng/ml (1,06-25,94), ve skupině s hyperplázií endometria byly zjištěny hodnoty $3,19\pm 1,19$ ng/ml (1,93-5,14) a ve skupině kontrolní se hodnoty pohybovaly na úrovních $4,2\pm 2,19$ ng/ml (0,89-11,33). V sérových hodnotách TFF2 nebyl mezi jednotlivými skupinami zjištěn statisticky významný rozdíl. Sérové hladiny TFF3 byly ve skupině s karcinomem endometria na úrovni $1,72\pm 1,52$ ng/ml (0,27-11,41), ve skupině

s hyperplázií endometria byly hladiny na úrovni $1,27 \pm 0,58$ ng/ml (0,49-2,93) a ve skupině kontrolní byly zjištěny hodnoty $1,54 \pm 2,04$ ng/ml (0,26-14,56). Hodnoty TFF3 byly ve skupině pacientek s karcinomem endometria významně vyšší než u pacientek s endometrální hyperplázií a ve skupině kontrolní (graf 5).

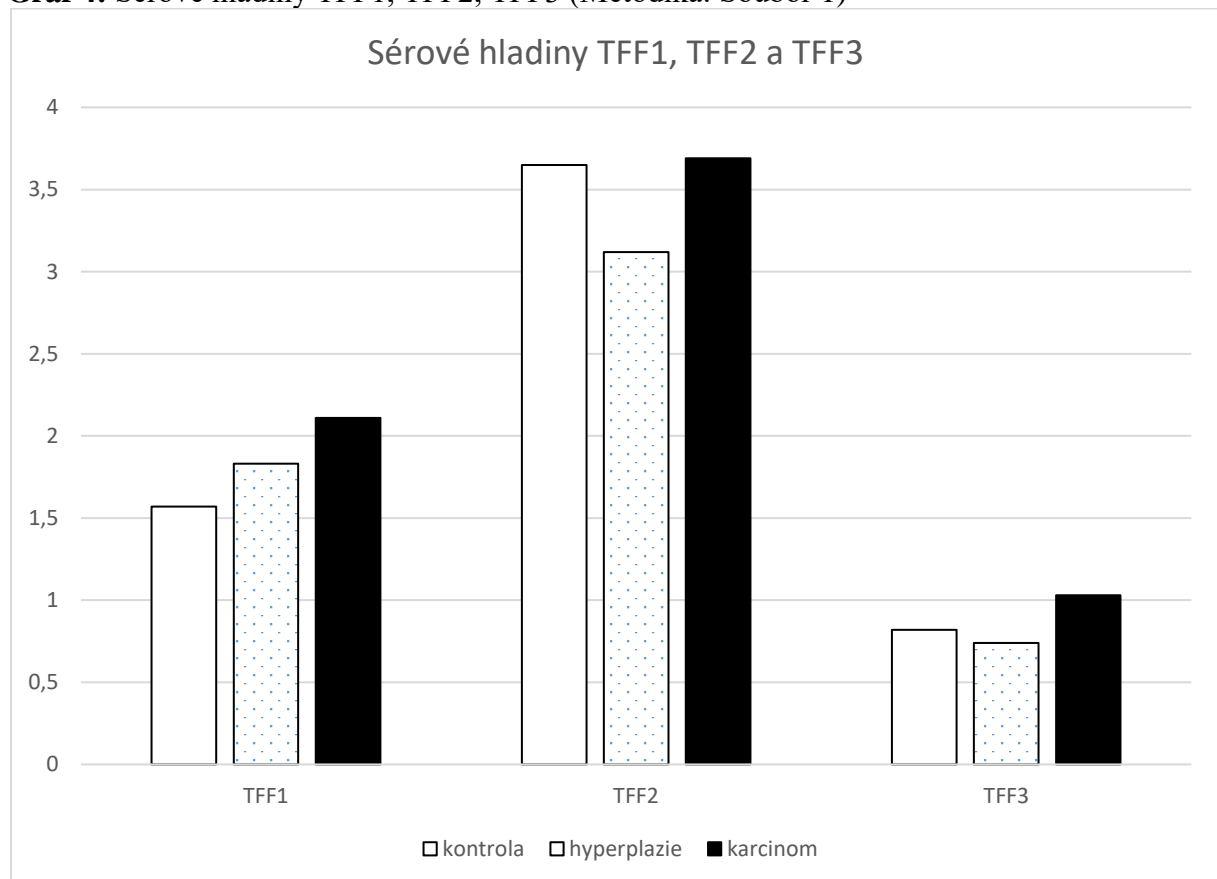
Tabulka 9: Sérové hladiny TFF1, TFF2, TFF3 (Metodika: Soubor 1)

	Karcinom (<i>n</i> = 53)					Hyperplázie (<i>n</i> = 6)					Kontroly (<i>n</i> = 30)					<i>p</i>
	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD	Med	Min	Max	
Věk	63.4	9.5	64	33	80	62.9	6.4	64	55	74	63.3	9.3	62	48	85	0.991 ^a
TFF1 (ng/ml)	3.04	3.55	2.11	0.48	20.97	2.15	1.14	1.83	0.96	4.14	2.47	2.23	1.57	0.51	9.52	0.726 ^b
TFF2 (ng/ml)	5.22	4.74	3.69	1.06	25.94	3.19	1.19	3.12	1.93	5.14	4.20	2.19	3.65	0.89	11.33	0.518 ^b
TFF3 (ng/ml)	1.72	1.52	1.40	0.27	11.41	1.27	0.58	1.13	0.49	2.93	1.54	2.04	0.97	0.26	14.56	0.003^b

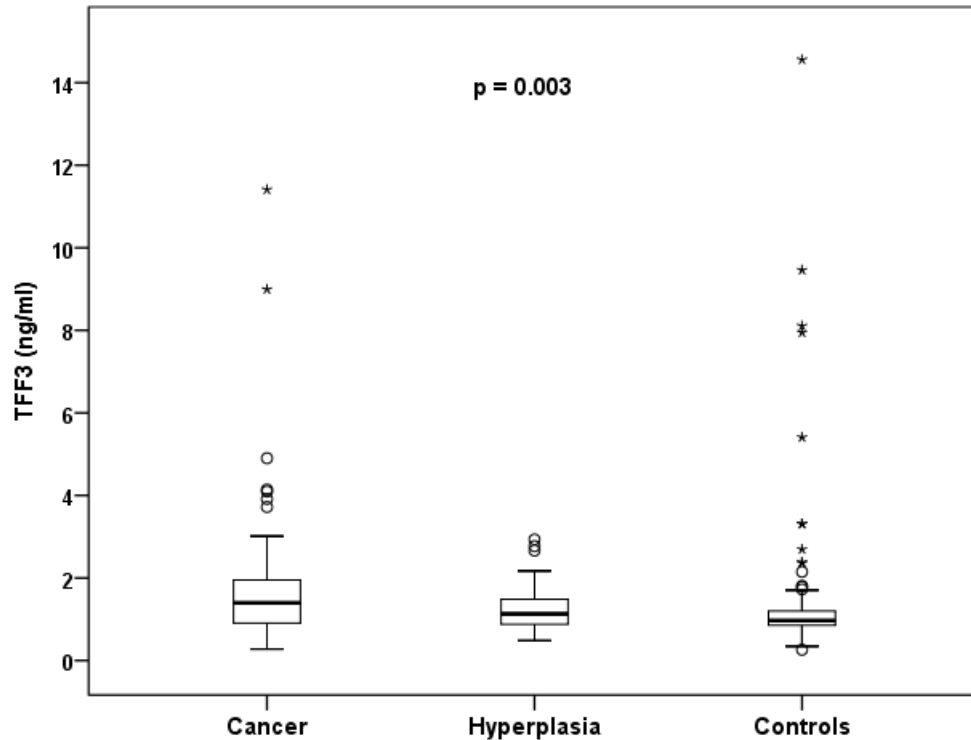
^aANOVA. ^bKruskal-Wallis test

Nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve věku ani ve dvou sledovaných markerech.

Graf 4: Sérové hladiny TFF1, TFF2, TFF3 (Metodika: Soubor 1)



Graf 5: Sérové hladiny TFF3 (Metodika: Soubor 1)



9.2. Hladiny TFF3, S100-A11, AIF-1 (Metodika: Soubor 2)

Statisticky významné rozdíly jsou mezi sledovanými skupinami u všech tří markerů (tabulka 10). Sérové hladiny TFF3 byly významně vyšší u pacientů s karcinomem endometria ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 5). Hladiny S100-A11 a AIF-1 byly vyšší u pacientů s endometriální hyperplázií v porovnání s kontrolní skupinou a též významně vyšší v případech karcinomu endometria oproti skupině pacientů s endometriální hyperplázií (graf 6 a 7). Sérové koncentrace TFF3 (graf 8 a 10), S100-A11 (graf 9 a 11) souvisejí se stádiem onemocnění a stavem lymfatických uzlin (tabulka 11,12 a 14). U markeru AIF-1 jsme tuto souvislost neprokázali. Sérové koncentrace TFF3, S100-A11 ani AIF-1 nesouvisí s grade nádoru (tabulka 13).

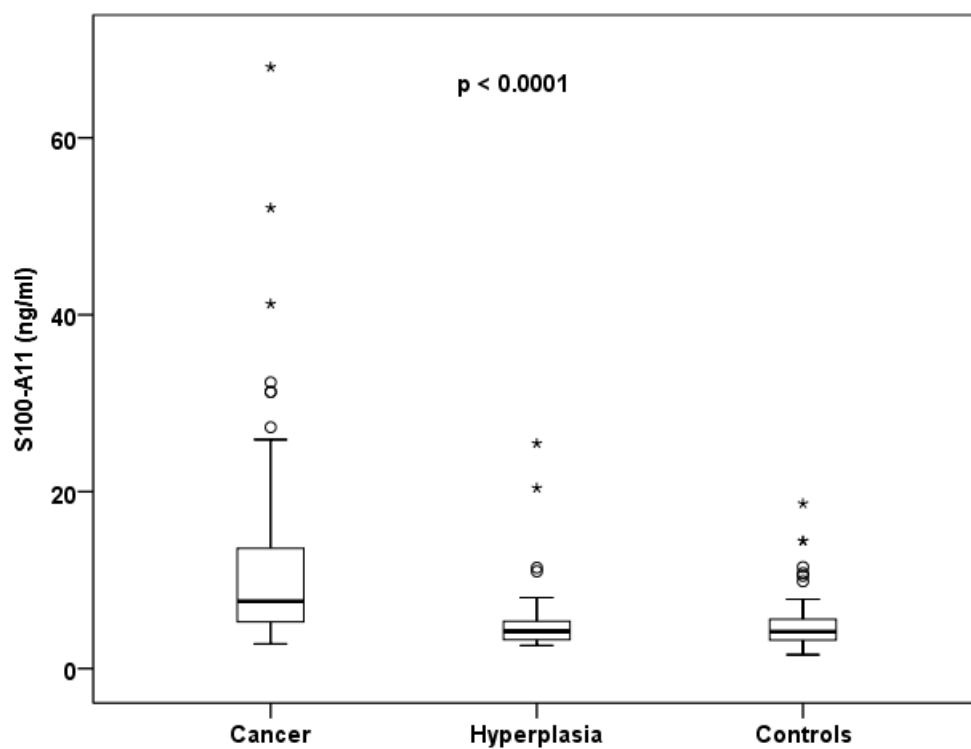
Tabulka 10: Sérové hladiny TFF3, S100-A11 a AIF-1 (Metodika: Soubor 2)

	Cancer (n = 98)				Hyperplasia (n = 43)				Controls (n = 91)				p	Cancer vs Hyperpl.	Cancer vs Controls	Hyperpl. vs Contr.			
	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD					Med	Min	Max
Age (years)	64.8	10.2	66	33	88	63.1	10.3	61	44	97	64.9	9.3	67	40	87	0.579 ^a			
TFF3 (ng/ml)	1.72	1.52	1.40	0.27	11.41	1.27	0.58	1.13	0.49	2.93	1.54	2.04	0.97	0.26	14.56	0.003 ^b	0.247	0.003	0.541
S100-A11 (ng/ml)	11.30	10.28	7.61	2.79	68.00	5.58	4.42	4.21	2.61	25.45	4.94	2.83	4.16	1.57	18.66	<0.0001 ^b	<0.0001	<0.0001	1.000
AIF-1 (pg/ml)	852	650	686	220	5168	442	146	397	189	756	421	178	385	142	1213	<0.0001 ^b	<0.0001	<0.0001	1.000

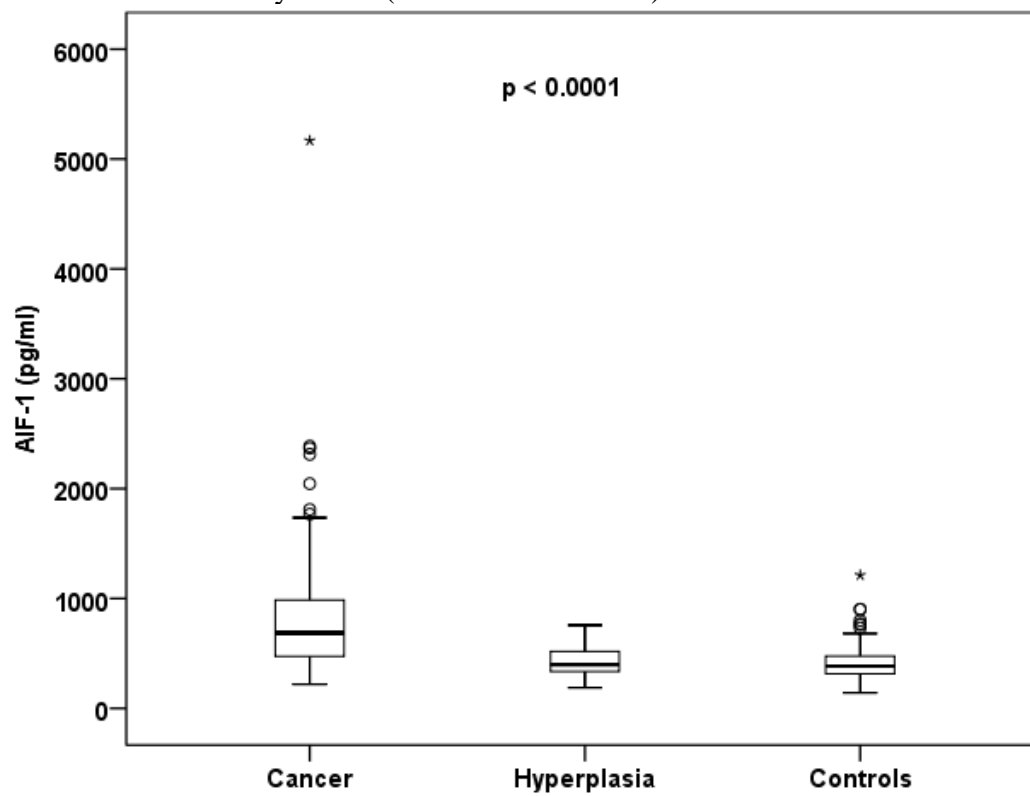
^aANOVA. ^bKruskal-Wallis test

Skupiny se neliší ve věku. Pacientky s karcinomem mají významně vyšší hodnoty TFF3 ve srovnání s kontrolními pacientkami. Pacientky s karcinomem mají významně vyšší hodnoty S100-A11 a AIF-1 ve srovnání s pacientkami s hyperplasií i s kontrolními pacientkami.

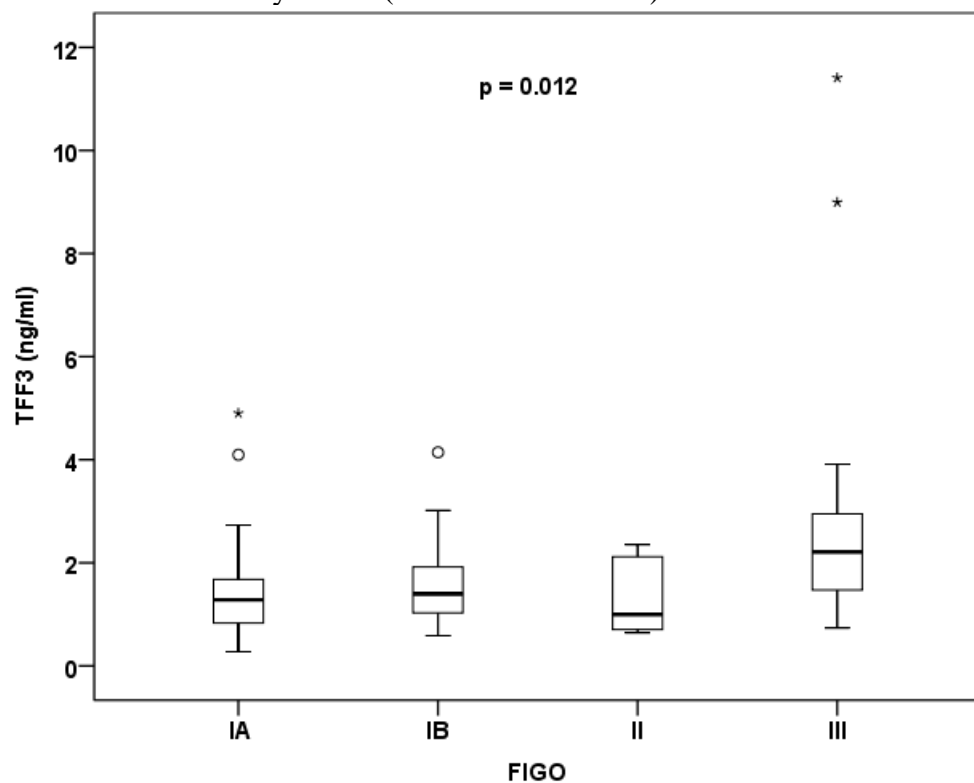
Graf 6: Sérové hladiny S100-A11 (Metodika: Soubor 2)



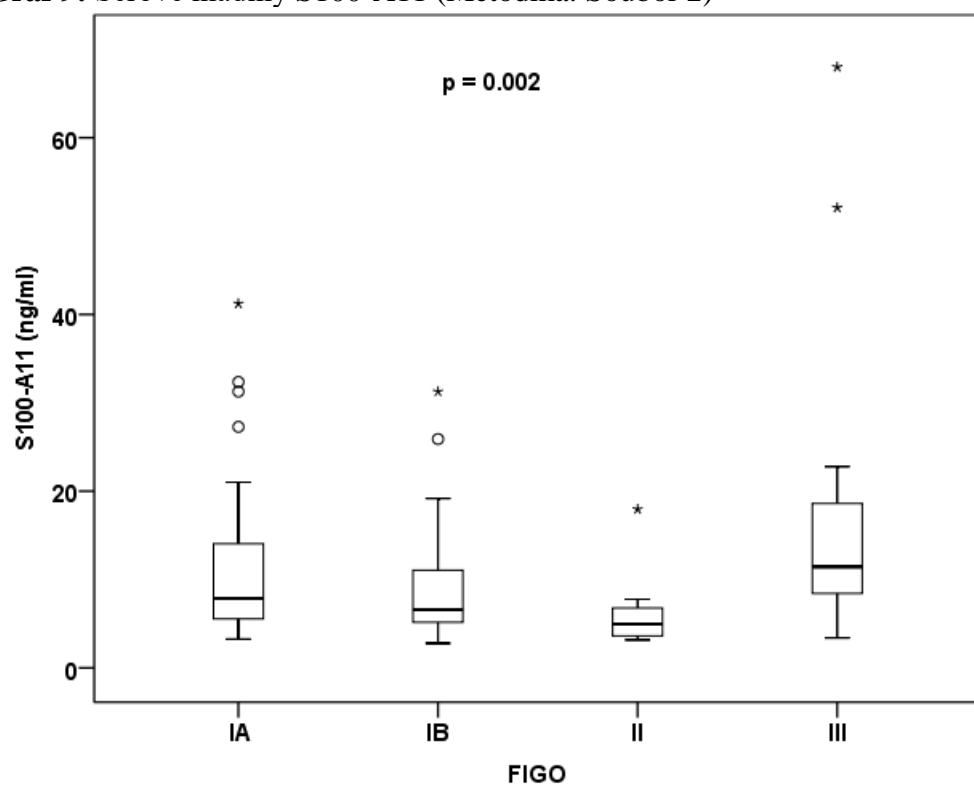
Graf 7: Sérové hladiny AIF-1 (Metodika: Soubor 2)



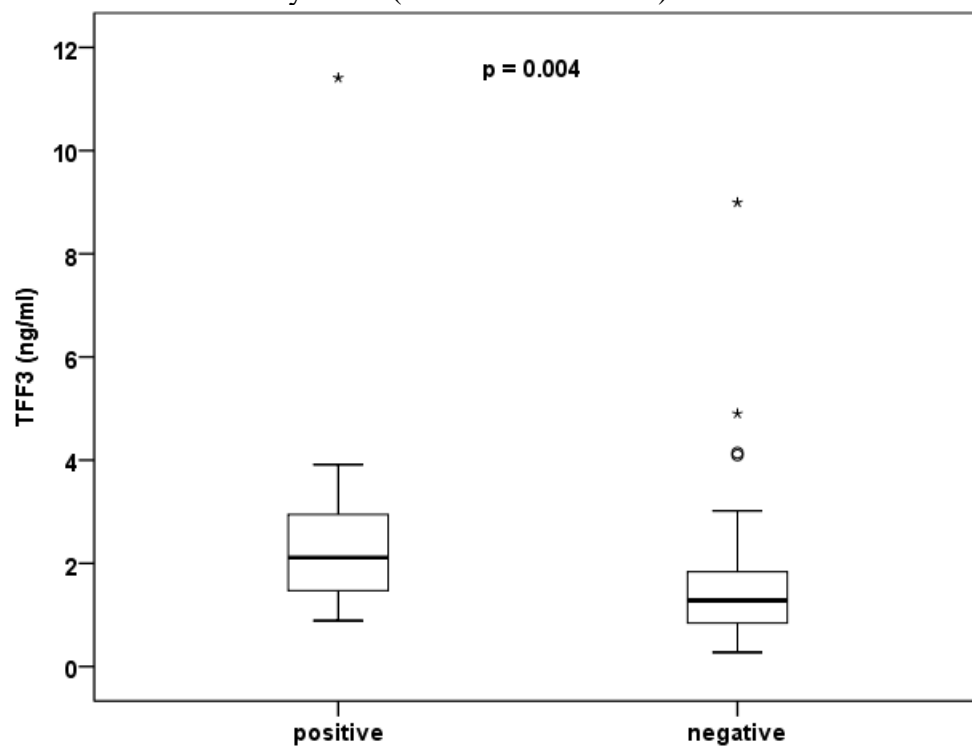
Graf 8: Sérové hladiny TFF3 (Metodika: Soubor 2)



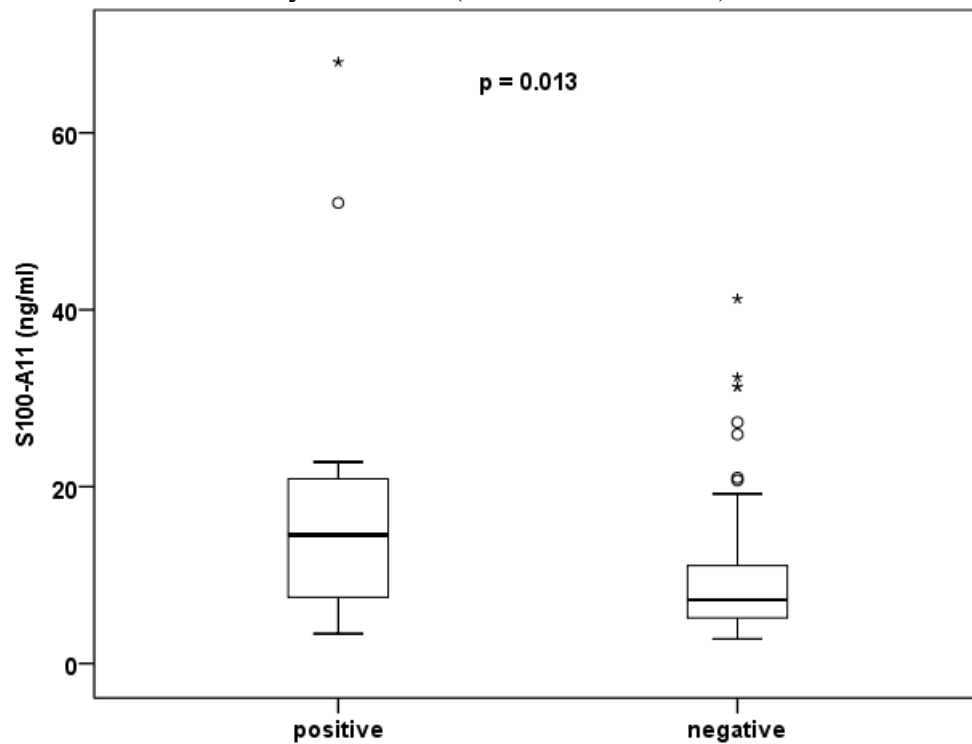
Graf 9: Sérové hladiny S100-A11 (Metodika: Soubor 2)



Graf 10: Sérové hladiny TFF3 (Metodika: Soubor 2)



Graf 11: Sérové hladiny S100-A11 (Metodika: Soubor 2)



Tabulka 11: Sérové hladiny TFF3, S100-A11 a AIF-1 (Metodika: Soubor 2)

	FIGO																		p						
	IA (n = 46)						IB (n = 23)						II (n = 12)							III (n = 17)					
	Mean	SD	Med	Min	Max		Mean	SD	Med	Min	Max		Mean	SD	Med	Min	Max			Mean	SD	Med	Min	Max	
TFF3 (ng/ml)	1.42	0.88	1.28	0.27	4.90		1.57	0.81	1.40	0.59	4.14		1.31	0.69	1.00	0.64	2.35		3.02	2.88	2.21	0.74	11.41	0.012^b	
S100-A11 (ng/ml)	10.99	8.35	7.87	3.25	41.22		9.77	7.28	6.59	2.79	31.27		6.10	4.04	4.97	3.16	17.96		17.84	17.04	11.44	3.38	68.00	0.002^b	
AIF-1 (pg/ml)	837	514	690	220	2386		785	495	619	286	2312		564	202	549	248	1038		1184	1125	877	291	5168	0.103 ^b	

^bKruskal-Wallis test

Statisticky významné rozdíly mezi skupinami dle FIGO u pacientek s karcinomem byly prokázány u dvou markerů: TFF3 a S100-A11.

Tabulka 12: Sérové hladiny TFF3 a S100-A11 (Metodika: Soubor 2)

	IA vs IB	IA vs II	IA vs III	IB vs II	IB vs III	II vs III
TFF3 (ng/ml)	1.000	1.000	0.015	1.000	0.184	0.061
S100-A11 (ng/ml)	1.000	0.034	0.211	0.363	0.166	0.007

Pacientky se stupněm III mají významně vyšší hodnoty TFF3 než pacientky se stupněm IA. Pacientky se stupněm II mají významně nižší hodnoty S100-A11 než pacientky se stupněm IA a než pacientky se stupněm III. Jiné signifikantní rozdíly prokázány nebyly.

Tabulka 13: Sérové hladiny TFF3, S100-A11 a AIF-1 (Metodika: Soubor 2)

	Grade															<i>p</i>
	1 (<i>n</i> = 54)					2 (<i>n</i> = 24)					3 (<i>n</i> = 20)					
	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD	Med	Min	Max	
TFF3 (ng/ml)	1.76	1.88	1.32	0.27	11.41	1.75	0.98	1.51	0.32	4.14	1.57	0.84	1.32	0.55	3.72	0.472 ^b
S100-A11 (ng/ml)	12.15	11.48	7.74	3.22	68.00	9.54	6.27	7.10	2.79	25.90	11.10	10.86	8.18	3.16	52.08	0.780 ^b
AIF-1 (pg/ml)	882	520	746	318	2386	761	453	660	220	1736	878	1067	555	248	5168	0.228 ^b

^bKruskal-Wallis test

Statisticky významná závislost mezi gradem a třemi markery u pacientek s karcinodem prokázána nebyla.

Tabulka 14: Sérové hladiny TFF3, S100-A11 a AIF-1 (Metodika: Soubor 2)

	positive (<i>n</i> = 14)					negative (<i>n</i> = 84)					<i>p</i>
	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD	Med	Min	Max	
TFF3 (ng/ml)	2.81	2.64	2.11	0.89	11.41	1.54	1.16	1.28	0.27	8.99	0.004^c
S100-A11 (ng/ml)	19.44	18.49	14.54	3.38	68.00	9.94	7.54	7.19	2.79	41.22	0.013^c
AIF-1 (pg/ml)	1234	1238	834	291	5168	788	474	669	220	2386	0.177 ^c

^cMann-Whitney *U*-test

Bylo prokázáno, že pozitivní pacientky mají významně vyšší hladiny TFF3 a S100-A11.

9.3. Hladiny TFF3, S100-A11, AIF-1 v korelaci s markery zánětlivé odpovědi (Metodika: Soubor 3)

Hladina TFF3 vykazovala pozitivní korelaci s věkem, IL-6, vitamínem D, kynureninem, poměrem močového neopterin/kreatininu a poměrem kynurenin/tryptofan. Rovněž hladiny S100-A11 a AIF-1 pozitivně korelovaly s IL-6 a TFF3.

Korelace mezi TFF3, S100-A11, AIF-1 a sledovanými markery zánětlivé odpovědi u pacientů s karcinomem endometria jsou zobrazeny v tabulce 15 (tabulka 15).

V kontrolní skupině pacientek s benigním nálezem na endometriu jsme prokázali pozitivní korelaci S100-A11 a AIF-1 ($r_s = 0,874$, $p = 0,0001$) (tabulka 16).

Tabulka 15: Korelace mezi laboratorními a klinickými parametry u pacientů s karcinomem endometria (n=98)

EC (n = 98)	Age	BMI	Leukocytes	Platelets	CRP	IL-6	Citrulline	Vitamin D	Alpha-tocopherol	Retinol	Kynurenine	Urinary neopterin/creatinine ratio	Tryptophan	Kynurenine/Tryptophan ratio	TFF3 (ng/ml)	S100-A11 (ng/ml)	AIF-1 (pg/ml)
TFF3 (ng/ml)	0,371	0,141	0,088	-0,028	0,176	0,291	0,191	-0,279	-0,073	0,004	0,312	0,215	-0,047	0,294	1,000	0,311	0,240
S100-A11 (ng/ml)	0,0002	0,167	0,389	0,782	0,083	0,004	0,060	0,006	0,476	0,967	0,002	0,034	0,646	0,004		0,002	0,017
	0,044	0,110	0,130	0,027	0,136	0,200	-0,167	-0,103	-0,037	-0,105	0,017	0,122	-0,090	0,082	1,000	0,778	
	0,670	0,280	0,203	0,790	0,182	0,049	0,101	0,314	0,720	0,304	0,869	0,232	0,383	0,425	0,002		
AIF-1 (pg/ml)	0,061	0,185	0,181	-0,035	0,213	0,253	-0,146	-0,050	-0,117	-0,065	0,098	0,198	-0,080	0,157	0,240	0,778	1,000
	0,549	0,068	0,075	0,732	0,035	0,012	0,151	0,630	0,251	0,524	0,341	0,052	0,438	0,126	0,017	<0,0001	

Tabulka 16: Korelace mezi laboratorními a klinickými parametry u pacientů v kontrolní skupině (n=24)

C (n = 24)	Age	BMI	Leukocytes	Platelets	CRP	IL-6	Citrulline	Vitamin D	Alpha-tocopherol	Retinol	Kynurenine	Urinary neopterin/creatinine ratio	Tryptophan	Kynurenine/Tryptophan ratio	TFF3 (ng/ml)	S100-A11 (ng/ml)	AIF-1 (pg/ml)
TFF3 (ng/ml)	0,261	0,181	0,033	-0,171	0,086	-0,130	-0,354	0,209	-0,253	0,316	0,071	-0,198	-0,082	-0,016	1,000	0,247	0,088
S100-A11 (ng/ml)	0,388	0,553	0,915	0,577	0,781	0,672	0,236	0,494	0,405	0,292	0,817	0,517	0,789	0,957		0,415	0,775
	-	0,170	-0,159	-0,006	0,339	0,319	0,326	0,335	-0,022	0,085	0,258	-0,082	0,544	-0,132	0,247	1,000	0,874
AIF-1 (pg/ml)	0,388	0,578	0,603	0,986	0,257	0,289	0,277	0,263	0,943	0,782	0,394	0,789	0,055	0,668	0,415		0,0001
	-	0,286	-0,198	0,121	0,386	0,205	0,260	0,286	0,280	0,272	0,214	-0,099	0,445	-0,170	0,088	0,874	1,000
	0,219	0,344	0,517	0,694	0,192	0,502	0,392	0,344	0,354	0,368	0,482	0,748	0,128	0,578	0,775	0,0001	

10. Diskuze

Nové molekulární přístupy ve výzkumu nádorů umožnily v poslední době identifikovat nové onkogeny/tumor supresorové geny, které by mohly hrát roli při rozvoji a progresi endometriálního karcinomu. Nalezení a sledování příslušných biomarkerů je zásadní pro management léčby pacientů s maligním onemocněním [181]. K identifikaci nových selektivních markerů pro karcinom endometria probíhají další výzkumy.

Trifoláty jsou fyziologicky exprimovány v epitelu gastrointestinálního traktu a to orgánově specificky. TFF1 je přítomen rovnoměrně ve sliznici žaludku, TFF2 ve sliznici distálního žaludku a duodena a TFF3 ve sliznici tenkého a tlustého střeva [153, 154, 156, 157, 182]. Tato orgánově specifická exprese bývá narušena při ulcerativních a inflamatorních onemocněních, kdy dochází ke zvýšené expresi TFF3 v místě žaludečního vředu [160]. Do současné doby bylo publikováno velmi málo údajů týkajících se významu a funkce trifolátů u karcinomu endometria.

Zvýšená exprese TFF1 byla nalezena u karcinomu prsu, žaludku, pankreatu, plic, endometria, ovaria, prostaty a hrdla děložního [171, 172]. U karcinomu prsu byla exprese TFF1 přítomna v 50% tumorů a je signifikantně asociována se stavem estrogenových receptorů, citlivostí na hormonální léčbu a s příznivou prognózou [173, 174, 183]. Ve všech ostatních nádorech byla však exprese TFF1 nezávislá na stavu estrogenních receptorů. Zvýšené sérové hladiny TFF1 korelovaly s pokročilostí bronchiálního adenokarcinomu a zejména specificky gobletového podtypu bronchoalveolárního karcinomu. Současně byly TFF1 pozitivní adenokarcinomy asociovány s horší prognózou než tumory negativní [184]. V naší práci jsme neprokázali zvýšené sérové hladiny TFF1 u pacientek s karcinomem endometria ve srovnání s pacientkami s endometriální hyperplázií nebo normálním endometriem.

TFF2 má velmi krátký biologický poločas a je volně vylučován ledvinami [185]. Jeho koncentrace v žaludeční šťávě vykazují velmi silnou diurnální variabilitu a dosahují nejvyšších hodnot v noci, zatímco v průběhu digesce se jeho hladina silně snižuje [31]. Vymizení TFF2 u geneticky programovaného myšího modelu karcinomu žaludku má za následek zvýšenou proliferaci a větší objem nádoru [186]. TFF2 vykazuje tumor-suppresorovou aktivitu v myším pankreatu a brání formaci mucinosních nádorů [187]. Ishibashi et al našli recentně zvýšené sérové hladiny TFF1 a TFF3 u pacientek s karcinomem prsu, zatímco hladiny TFF2 byly vyšší u zdravých kontrol. Autoři tento rozdíl vysvětlují možným vlivem hladin TFF1 a TFF3 na hladinu TFF2 [188]. V naší práci jsme našli dvakrát vyšší sérové hladiny TFF2 ve všech sledovaných skupinách, než byly hladiny TFF1 a TFF3. Rozdíly mezi hladinami TFF2 u

pacientek s endometriálním karcinomem, endometriální hyperplázií a normálním endometriem nebyly statisticky signifikantní.

Z dostupných publikací byla zvýšená exprese TFF3 na úrovni genu prokázána u endometriálního karcinomu ve srovnání s karcinomem serosním a stejně tak u nízcce diferencovaného endometriálního karcinomu ve srovnání s normálním endometriem [176, 189, 190]. Bignotti et al našli zvýšenou imunoexpresi proteinu TFF3 u 79% nízcce diferencovaných karcinomů endometria a u 18 % vzorků normální sliznice děložní [191]. Původ cirkulujících hladin TFF3 není zcela zřejmý, i když TFF3 je exprimováno ve tkáních ženského genitálu a in vitro studie prokázaly, že stejně jako u TFF1, i exprese TFF3 je regulována estrogenem [192]. Absence fluktuací sérových hladin TFF3 v průběhu menstruačního cyklu však ukazuje, že cirkulující TFF3 pochází převážně z tkání, které nejsou pod vlivem estrogenu [193]. V naší práci jsme našli významně zvýšené sérové hladiny TFF3 u karcinomu endometria ve srovnání s hladinami u pacientek s endometriální hyperplázií a benigním histopatologickým nálezem.

Calgizzarin (S100-A11) je součástí početné skupiny S100 proteinů. V organizmu mají celou řadu funkcí, a to jak na úrovni intracelulární, tak i extracelulární [111-113]. Význam jednotlivých proteinů ze skupiny S100 je zkoumán ve vztahu k četným typům nádorů. Calgizzarin (S100-A11) je považován za možný sérový marker karcinomu endometria [128]. Nadměrná exprese proteinu S100-A11 byla prokázána u malobuněčného karcinomu plic a děložních leiomyomů [129, 130]. Bylo prokázáno, že calgizzarin blokuje apoptózu v buňkách děložního leiomyosarkomu [129]. Zdá se, že svou úlohu hraje i v případě karcinomu prsu [131].

Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) je považován za spouštěč zánětlivé reakce organizmu. V lidském těle byl AIF-1 ve významném množství prokázán v lymfatické tkáni [140], v zárodečných buňkách varlete a dále zejména v červené pulpě sleziny [141]. Kromě všeobecně prozánětlivého efektu byla jeho nadměrná exprese prokázána u maligních gliomů a duktálního karcinomu prsu [146, 149, 150].

Naše data prokazují zvýšené sérové koncentrace TFF3, S100-A11 a AIF-1 u pacientů s karcinomem endometria oproti kontrolní skupině pacientů s fyziologickým nálezem na endometriu či hyperplázií endometria. Dále sérové hladiny TFF3 a S100-A11 korelovaly se stadiem nádoru a postižením lymfatických uzlin. Tato zjištění naznačují, že by tyto sledované molekuly mohly sloužit jako biomarkery v diagnostice, předoperačnímu stanovení stagingu a případně následnému monitorování pacientů v průběhu léčby.

Růst nádoru a jeho šíření je spojeno se zánětlivou odpovědí organizmu. Právě zánětlivá reakce, která podporuje růst nádoru, je v současné době pokládána za jeden z charakteristických znaků [194]. Makrofágy mohou představovat důležité efektoary protinádorové odpovědi, ale

také přispívají k růstu nádoru a jeho šíření [195, 196]. Aktivované makrofágy produkují neopterin. Zvýšené sérové koncentrace neopterinu, popisovány u celé řady onemocnění, vedou ke stimulaci makrofágů prostřednictvím interferonu gama [197, 198]. Neopterin je tedy nespecifickým biomarkerem. Jeho zvýšené sérové koncentrace díky chronické stimulaci makrofágů pozorujeme dále u celé řady pokročilých maligních tumorů, včetně gynekologických malignit a obvykle jsou považovány za negativní prognostický marker těchto tumorů [199, 200]. Vysoké koncentrace neopterinu byly spojovány s přítomností laboratorních parametrů imunitní dysfunkce jak v mikroprostředí nádoru [201, 202] tak i v séru [203].

Kynurenin je tvořen přeměnou tryptofanu v reakci katalyzované enzymem indolamin 2,3-dioxygenázou (IDO). Tvorba tohoto enzymu je indukována interferonem gama. Vysoké hladiny kynureninu působí cytotoxicky proti nádorovým buňkám [204]. Nedostatek tryptofanu či kynureninu má významný vliv na potlačení imunitní odpovědi [205]. Nízké koncentrace vitamínu D jsou prediktivním faktorem špatné prognózy u mnoha primárních nádorů. Proto není překvapující námi zjištěná inverzní korelace hladin vitamínu D a TFF3.

Všechny námi sledované biomarkery (TFF3, S100-A11, AIF-1) vykazovaly korelaci s markery zánětlivé odpovědi. Významnou korelaci jsme prokázali mezi všemi třemi markery a IL-6, zatímco s močovým neopterinem, sérovým kynureninem a poměrem kynurenin/tryptofan koreloval pouze TFF3. Žádný ze sledovaných biomarkerů nekoreloval s hladinami CRP. Byla prokázána pozitivní korelace mezi velikostí tumoru a zvýšenou hladinou sérových tumor markerů současně s alterací hladin neopterinu, kynureninu a poměru kynurenin/neopterin.

V budoucích studiích by se všechny tyto biomarkery měly zkoumat společně, aby bylo možné zhodnotit vliv jednotlivých léčebných postupů na změnu sérových koncentrací těchto markerů. Studie by měly též zahrnovat výzkum markerů toxicity systémové léčby, což je často opomíjeno. Spolehlivé biomarkery pro monitoring a predikci toxicity chemoterapie či radioterapie stále nebyly objeveny [206-208]. S výjimkou hematologické toxicity jsou vedlejší nežádoucí účinky onkologické léčby posuzovány většinou retrospektivně či až během kontrol při probíhající protinádorové léčbě. Zajímavá je zpráva publikována českými autory v roce 2016, která prokazuje souvislost mezi koncentrací neopterinu v séru a výskytem komplikací chemoterapie a radiační léčby u pacientů s karcinomem rekta [180].

11. Závěr

Prokázali jsme zvýšené hladiny TFF3, ale ne TFF1 a TFF2 u pacientek s onemocněním karcinomu endometria. Z výsledků naší studie je zřejmé, že TFF3 by mohl hrát roli jako marker onemocnění u pacientek s karcinomem endometria. Další studie jsou nutné pro detailnější objasnění jeho biologické role při rozvoji tohoto onemocnění.

TFF3, S100-A11 a AIF-1 jsou potencionálními biomarkery pro karcinom endometria. Elevace hladin TFF3 a S100-A11 koreluje se stadiem karcinomu endometria (stage) a postižením lymfatických uzlin. Růst nádoru a vyšší objem nádorové hmoty jsou též spojeny se zvýšenou hladinou markerů zánětlivé odpovědi.

12. Souhrn

Cíl: Stanovení korelace sérových hladin TFF1, TFF2, TFF3, S100-A11 a AIF-1 u pacientek s endometriální hyperplazií a karcinomem endometria. Zhodnocení korelace s markery imunitní a zánětlivé odpovědi k vyloučení vlivů patologického nutričního stavu. Trefoil peptidy patří do skupiny malých peptidů, jejichž exprese je místně i tkáňově specifická. S100-A11 (Calgizzarin) díky svému intracelulárnímu a extracelulárnímu působení ovlivňuje celou řadu biologických procesů. AIF-1 (Allograft inflammatory factor) je sérový protein, který hraje významnou úlohu v rozvoji zánětlivé reakce organismu.

Typ studie: Experimentální studie

Název a sídlo pracoviště: Porodnicko-gynekologická klinika, FN a LF UP, Olomouc, Oddělení klinické biochemie, Středomoravská nemocniční a.s., Nemocnice Prostějov.

Metodika: V období od 2012 do 2015 byly zkoumány celkem tři soubory pacientek.

První soubor tvořilo celkem osmdesát devět žen, které podstoupily hysteroskopii a biopsii endometria pro krvácení v postmenopauze. U padesáti tří pacientek, ve věku (průměr±standardní odchylka) 63,4±9,5 (33-80 let) byl diagnostikován karcinom endometria, u šesti pacientek ve věku 62,9±6,4 (55-74 let) byla diagnostikována hyperplazie endometria a třicet pacientek ve věku 63,3±9,3 (48-62 let) s histologicky verifikovanou atrofií endometria

tvorilo kontrolní soubor. V den výkonu byl každé pacientce odebrán vzorek venózní krve, který byl následně vyšetřen a byly stanoveny hladiny TFF1, TFF2 a TFF3.

Do druhé studované skupiny bylo postupně zařazeno celkem 232 pacientek. 98 pacientek s histologicky prokázaným karcinomem endometria (průměr±standardní odchylka) 65±10 (33-80 let), které byly plánovány k operační léčbě. Dále do tohoto souboru bylo zařazeno 43 pacientek 63±10 (44-97) s hyperplázií endometria stanovenou histopatologicky z materiálu získaného při kyretáži a hysteroskopii a 91 žen 65±9 (48-87) s negativním hysteroskopickým nálezem a benigním histologickým nálezem endometria. Každé pacientce byla odebrána venózní krev a odeslána na laboratorní vyšetření TFF3, S100-A11 a AIF-1.

Do třetí studované skupiny bylo zařazeno konsektivně 98 pacientek s histologicky prokázaným karcinomem endometria (průměr±standardní odchylka) 65±10 (33-80 let), které podstoupily hysterektomii s oboustrannou adnexektomií, pánevní a paraaortální lymfadenektomií. Operační výkon byl proveden laparotomicky, laparoskopicky či roboticky. Dále 24 pacientek ve věku 55±12 (36-80 let), které se podrobily elektivní hysterektomii pro nemaligní onemocnění. Hysterektomie byla provedena buď otevřenou laparotomickou cestou anebo jako laparoskopicky asistovaná vaginální hysterektomie. Do těchto dvou skupin byly pacientky alokovány náhodně. Každé pacientce byla v den operace před započítím chirurgického výkonu odebrána venózní krev a odeslána na laboratorní vyšetření biomarkerů TFF3, S100-A11, AIF-1 a sérových markerů zánětlivé odpovědi. Zkoumanými sérovými markery zánětlivé odpovědi jsou: leukocyty, trombocyty, C reaktivní protein, IL-6, citrulin, vitamín D, alfa-tokoferol, retinol, kynurenin a tryptofan. Ve stejnou dobu byly odebrány vzorky moči, které byly odeslány k analýze poměru neopterin/kreatinin. Další klinické či laboratorní parametry, které byly hodnoceny, jsou: věk pacientky, body mass index (BMI), počet získaných lymfatických uzlin, grade, stage a postižení lymfatických uzlin. BMI byl kalkulován použitím standardního vzorce (tělesná hmotnost/výška²).

Výsledky: Hladiny TFF3 byly významně vyšší u pacientek s karcinomem endometria, ale ne ve skupině žen s endometriální hyperplázií. Hladiny TFF1 a TFF2 se v jednotlivých histopatologických skupinách významně nelišily.

Hladiny S100-A11 a AIF-1 byly vyšší u pacientů s endometriální hyperplázií v porovnání s kontrolní skupinou a též významně vyšší v případech karcinomu endometria oproti skupině pacientů s endometriální hyperplázií. Sérové koncentrace TFF3 a S100-A11 souvisejí se stádiem onemocnění a stavem lymfatických uzlin. U markeru AIF-1 jsme tuto

souvislost neprokázali. Sérové koncentrace TFF3, S100-A11 ani AIF-1 nesouvisí s grade nádoru.

Prokázali jsme pozitivní korelaci mezi velikostí tumoru a zvýšenou hladinou všech sledovaných tumor markerů (TFF3, S100-A-11, AIF-1) současně s alterací hladin neopterinu, kynureninu a poměru kynurenin/neopterin.

Závěr: Prokázali jsme zvýšené hladiny TFF3, ale ne TFF1 a TFF2 u pacientek s karcinomem endometria. U žen s endometrální hyperplázií nebyly hladiny TFF1, TFF2 a TFF3 zvýšeny. Elevace hladin TFF3 a S100-A11 koreluje se stadiem karcinomu endometria (stage) a postižením lymfatických uzlin. Růst nádoru a vyšší objem nádorové hmoty jsou též spojeny se zvýšenou hladinou markerů zánětlivé odpovědi.

Klíčová slova: TFF, S100-A11, AIF-1, karcinom, endometrální, trefoil faktor, sérový, zánětlivá odpověď, výživa, postižení lymfatických uzlin

13. Summary

Aim: To study correlation TFF1, TFF2, TFF3, S100-A11 and AIF-1 serum levels in patients with endometrial hyperplasia and endometrial cancer. To evaluate correlation of these markers with inflammatory response biomarkers to exclude influence of pathological nutritional status. Trefoil peptides are a family of small proteins that are expressed in a site-specific fashion by certain epithelial tissues. S100-A11 (Calgizzarin), due to its intracellular and extracellular activities, affects a variety of biological processes. AIF-1 is a serum protein that plays a significant role in the development of inflammatory response.

Design: Experimental study

Setting: Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital, Medical Faculty, Palacký University, Olomouc, Czech Republic; Department of Laboratory Biochemistry, Central Moravian Hospital Trust, Member of Agel holding, Prostějov, Czech Republic.

Methods: During the time period from 2012 to 2015 three sets of patients were examined. The first study group consisted of eighty-nine women underwent hysteroscopy and endometrial

biopsy for postmenopausal bleeding. Fifty three patients, at the age of (mean±standard deviation) 63,4±9,5 (33-80 years) were diagnosed with endometrial cancer, six patients at the age of 62,9±6,4 (55-74 years) were diagnosed with endometrial hyperplasia and thirty patients at the age of 63,3±9,3 (48-62 years) diagnosed with endometrial atrophy represented control group. At the day of surgery the venous blood was sampled and subsequently examined for the levels of TFF1, TFF2 and TFF3. The second study group included 232 consecutive patients with histologically confirmed endometrial cancer (mean±standard deviation) 65±10 (33-80 years) scheduled for surgery and 43 patients (mean±standard deviation) 63±10 (44-97 years) with endometrial hyperplasia diagnosed during hysteroscopy and histologically verified. 91 patients (mean±standard deviation) 65±9 (48-87 years) with benign endometrial histology served as a control group. Venous blood samples were taken from each patient and examined for TFF3, S100-A11 and AIF-1. The third study group consisted of 98 patients (mean±standard deviation) 65±10 (33-80 years) with histologically confirmed endometrial cancer who underwent hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy, pelvic and paraaortic lymphadenectomy. These procedures were performed by laparotomic, laparoscopic or robotic approaches. 24 patients (mean±standard deviation) 55±12 (36-80 years), who were scheduled for elective total hysterectomy for non-malignant disease, constituted a control group. The patients were randomly allocated to receive either an abdominal hysterectomy or laparoscopy assisted hysterectomy for their benign disease. Venous blood samples were collected from each patient to examine TFF3, S100-A11, AIF-1 and inflammatory response biomarkers serum levels. The investigated inflammatory serum markers were: leukocytes, platelets, CRP, IL-6, citruline, vitamine D, alpha-tocopherol, retinol, kynurenine and tryptofan. Urinary samples were collected at the same time for determination of the urinary neopterin/kreatinine ratio. Other parameters evaluated were: patient age, body mass index (BMI), number of lymph nodes obtained, stage and grade.

Results: TFF3 levels were significantly higher in patients with endometrial carcinoma but not in endometrial hyperplasia subgroup. The levels of TFF1 and TFF2 were not different in selected histopathological subgroups. S100-A11 and AIF-1 levels were higher in endometrial hyperplasia patients than in controls and also significantly higher in endometrial cancer than in endometrial hyperplasia patients. The serum concentrations of TFF3, S100-A11, but not AIF-1 were associated with tumor stage and lymph node status. The serum concentrations of TFF3, S100-A11 and AIF-1 were not associated with tumor grade. All three markers (TFF3,

S100-A11, AIF-1) show correlation with tumor size together with alteration of neopterin and kynurenine levels and kynurenine/neopterin ratio in serum.

Conclusion: We have shown elevated levels of TFF3 but not of TFF1 and TFF2 in patients with endometrial cancer. TFF1, TFF2 and TFF3 levels were not elevated in patients with endometrial hyperplasia. Increase in serum levels of TFF3 and S100-A11 correlates with stage and lymph nodes involvement. Tumor growth and tumor mass are associated with elevated serum levels of inflammatory response markers.

Key words: TFF, S100-A11, AIF-1, inflammatory, carcinoma, endometrial, trefoil factor, serous, nutrition, lymph nodes involvement

14. Seznam publikací a přednášek

14.1. Práce související s disertační prací

a) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v časopise s IF

1. Pilka, R., Marek, R., Adam, T., Kudela, M., Ondrová, D., Neubert, D., Hambálek, J., Maděrka, M., Solichová, D., Kujovská Krčmová, L., and Melichar, B.: Systemic inflammatory response after open, laparoscopic and robotic surgery in endometrial cancer patients.
Anticancer research, 2016, 36: 2909-2922 IF 1,937
This study was supported by IGA MZ CR grant NT 13566-4/2012
2. Pilka, R., Neubert, D., Stejskal, D., Krejčí, G., Švesták, M., Marek, R., Adam, T., Sobková, K., Ondrová, D., Hambálek, J., Maděrka, M., Solichová, D., Kujovská Krčmová, L., Javorská, L., Melichar, B.: Serum concentrations of TFF3, S100-A11 and AIF-1 in association with systematic inflammatory response, disease stage and nodal involvement in endometrial cancer.
Pteridines 2018, 29(1), 1-7 IF 0,621

b) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v recenzovaném časopise

1. Neubert, D., Pilka, R., Ondrová, D., Hambálek, J., Maděrka, M., Sobková, K., Stejskal, D., Krejčí, G.: Elevace hladin TFF3 u karcinomu endometria
Česká Gynekologie, 2018

c) Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v recenzovaném časopise

1. Neubert, D., Pilka, R., Stejskal, D., Krejčí, G.: Význam trifolátů u gynekologických onemocnění
Česká Gynekologie, 2016, 6, s.444-450

d) Publikovaná abstrakta

1. Pilka, R., Stejskal D., Krejčí, G., Švesták, M., Marek, R., Adam, T., Sobková, K., Ondrová, D., Neubert, D., Hambálek, J., Maděrka, M., Solichová, D., Kujovská Krčmová, L., Javorská, L., Melichar, B.: Serum concentrations of TFF3, S100-A11 and AIF-1 in association with systemic inflammatory response and nodal involvement in endometrial cancer.
ESGO CONGRESS, Vienna, 4.-7.11.2017, Sborník s.245

14.2. Ostatní publikace

a) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v recenzovaném časopise – hlavní autor

1. Neubert, D., Kudela, M., Pilka, R., Ondrová, D.: Změny endometria při léčbě karcinomu prsu tamoxifenem.
Čes.Gynekol., Supplementum I, 1999, s.15
2. Neubert, D., Pilka, R., Dzvinčuk, P.: Kombinovaná transabdominální a transuretrální extirpace protrudující suburetrální pásky – kazuistika
Gynekolog, 4/2014

b) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v recenzovaném časopise – spoluautor

1. Pilka R., Marek, R, Dzvinčuk P., Kudela, M., Hejtmánek, P., Michnová, L., Neubert, D.: Robotem asistovaný staging karcinomu endometria ve fázi „learning Curve“ – srovnání se standardní laparoskopii.
Gynekolog, 2011, 5, s.167-171
2. Pilka, R., Marek, R., Dzvinčuk, P., Kudela, M., Neubert, D.
Robotem asistovaná radikální hysterektomie ve fázi “learning curve” a její srovnání se standardní laparoskopicky asistovanou radikální vaginální a otevřenou radikální chirurgií.
Česká Gynekol., 2013, 1, s. 20-27
Práce byla podpořena grantem IGA MZ CR NT13566-4/2012.
3. Pilka R., Gagyor D., Študentová M., Neubert D., Dzvinčuk P.: Laparoskopická a robotická sakropexe: retrospektivní studie zkušeností z learning curve a následného follow-up, Česká Gynekologie, 2017, 4, s.261-267
4. Maškulíková Z., Studničková M., Neubert D., Pilka R.: Robotická sakrokolpopexe – dvě kazuistiky a literární přehled., Čes.Gynek., 2015, 5, s. 372–377

c) Publikovaná abstrakta

1. Pilka, R., Kudela, M., Neubert, D.: Riziko hysteroskopie u onemocnění karcinomu endometria (RHOCE) – průběžná zpráva o multicentrické studii.
Čes. Gynekol. Supplementum I, 1999, s 14.
2. Pilka, R., Stejskal, D., Svestak, M., Ondrova, D., Neubert, D., Huml, K.: New laboratory markers in the diagnosis of endometrial cancer -The pilot study
Int J Gyn Cancer, Volume 23, October 2013, Supplement 18, pp. 1113

IF 1,9

3. Pilka, R., Dzvinčuk, P., Neubert, D., Hambálek, J., Maškulíková, Z., Maděrka, M.: Laparoskopická sakropexe – komplikace závěsného stehu
Praktická Gynekologie, 2014, 18, Suppl.1, s.21
4. Dzvinčuk, P., Pilka, R., Marek, R., Kudela, M., Neubert, D., Táborská, Š.: Learning curve „robotic radical hysterectomy compared to standardized laparoscopy assisted radical vaginal and open radical hysterectomy.“
SERGS, 13.-15.6.2013, London, England, Sborník 0019
5. Gágyor, D., Pilka, R., Dzvinčuk, P., Študentová, M., Neubert, D.: Laparoskopická a robotická sakropexe – perioperační výsledky.
Gynekolog, Supplementum, XXVI. Česká Urogynekologie, Praha 2017, s.17

d) Přednášky a postery – hlavní autor

1. Neubert, D., Kudela, M., Pilka, R., Ondrová, D.: Změny endometria při léčbě karcinomu prsu tamoxifenem.
Kontroverze v onkogynekologii, XXXVI. Mezikrajský seminář, Ostrava, 1999
2. Neubert, D.: Močová inkontinence u žen.
XI. kongres praktických lékařů a sester, Olomouc, 25.-26.4.2013
3. Neubert, D.: Močová inkontinence u žen.
Doporučené postupy a aktuality pro praxi 2013, Vzdělávací seminář, společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, Olomouc, 14.9.2013
4. Neubert, D.: Novinky v urogynekologii pro VPL, organizace péče o inkontinentní pacientky.
Seminář moravských VPL a sester, Olomouc, 9.10.2014
5. Neubert, D., Pilka, R.: Kombinovaná transvesikální a transuretrální exstirpace protrudující suburetrální TVT-O pásky, kazuistika s videoprezentací.
Poruchy pánevní statiky a urogynekologie, Jihlava, 20.2.2014

e) Přednášky a postery – spoluautor

1. Pilka, R., Kudela, M., Neubert, D.: Riziko hysteroskopie u onemocnění karcinomu endometria (RHOCE) – průběžná zpráva o multicentrické studii.
Kontroverze v onkogynekologii, Ostrava, 21. – 22.5.1999
2. Pilka, R., Dzvinčuk, P., Kudela, M., Marek, R., Neubert, D.: Robotické operace v gynekologii
Onkologický kongres Znojmo, 5.10.2012
3. Pilka, R., Dzvinčuk, P., Marek, R., Neubert, D.: Roboticky asistovaná radikální hysterektomie u pacientek s časným stadiem karcinomu cervixu, srovnání výsledků s laparoskopicky asistovanou radikální vaginální hysterektomií

XXI. konference sekce gynekologické endoskopie ČGPS ČLS JEP, Poděbrady 19.-20.10.2012

4. Pilka, R., Neubert, D., Dzvinčuk, P.: Robotická sakrokolpopexe
State of the art v urogynékológii a rekonstrukční gynekológii, Zlín, 1-2.listopadu 2013
5. Pilka, R., Neubert, D., Dzvinčuk, P.: Laparoskopická uretrolýza
State of the art v urogynékológii a rekonstrukční gynekológii, Zlín, 1-2.listopadu 2013
5. Pilka, R., Stejskal, D., Švestak, M., Ondrova, D., Neubert, D., Huml, K., Prochazka, M.: New laboratory markers in the endometrial cancer patients
15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, Melbourne, Australia, November 8-11., 2014
6. Pilka, R., Dzvinčuk, P., Neubert, D., Hambálek, J., Maškulíková, Z., Maděrka, M.:
Laparoskopická sakropexe – komplikace závěšného stehu
XXIII. Česká Urogynékológie 2014 celostátní konference s mezinárodní účastí,
Clarion Hotel, Praha, 4.prosince 2014
7. Adamík, Z., Mlčoch, M., Neubert, D.: Bulkamid u mladých žen.
Poruchy pánevní statiky a urogynékológie, Jihlava, 19.2.2015
8. Pilka, R., Dzvinčuk, P., Neubert, D., Hambálek, J., Maškulíková, Z., Maděrka, M.:
Laparoskopická sakropexe komplikovaná osteolýzou promontoria
XVI. kongres gynekologické endoskopie SGPS
Horný Smokovec, Slovensko, 16.-17.4.2015
9. Pilka, R., Hostinská, E., Dzvinčuk, P., Neubert, D., Maděrka, M., Hambálek, J.,
Maškulíková, Z.: Laparoskopická sakrokolpopexe komplikovaná osteolýzou
promontoria, 25. Schwarzův den, Košice, 16.11.2016
10. Pilka, R., Stejskal D., Krejčí, G., Švesták, M., Marek, R., Adam, T., Sobková, K.,
Ondrová, D., Neubert, D., Hambálek, J. Maděrka, M., Solichová, D., Kujovská
Krčmová, L., Javorská, L., Melichar, B.: Serum concentrations of TFF3, S100-A11
and AIF-1 in association with systemic inflammatory response and nodal involvement
in endometrial cancer.
ESGO CONGRESS, Vienna, 4.-7.11.2017, Sborník s.245
11. Dzvinčuk, P., Pilka, R., Marek, R., Kudela, M., Neubert, D., Táborská, Š.: Learning
curve „robotic radical hysterectomy compared to standardized laparoscopy assisted
radical vaginal and open radical hysterectomy.
SERGS, 13.-15.6.2013, London, England, Sborník 0019
12. Dzvinčuk, P., Pilka, R., Gágyor, D., Maškulíková, Z., Neubert, D.: Srovnání robotické
a laparoskopické sakrokolpopexe.
XVII. kongres sekcie gynekologickej endoskopie SGPS, Tále, Nízke Tatry,
Slovensko, 14.-15.4.2016

13. Hambálek, J., Pilka, R., Marek, R. Adam, T., Kudela, M., Ondrová, D., Neubert, D., Maděrka, M., Solichová, D., Melichar, B.: Systémová zánětlivá odpověď po laparotomickém, laparoskopickém a robotickém stagingu u pacientek s karcinomem endometria
XXV. konference Sekce gynekologické endoskopie ČGPS ČLS JEP, 20.-22.10.2016 Olomouc
14. Dzvinčuk, P., Pilka, R., Gágyor, D., Maškulíková, Z., Neubert, D.: Srovnání robotem asistované a laparoskopické sakrokolpopexe.
XXV. konference Sekce gynekologické endoskopie ČGPS ČLS JEP, 20. - 22. října 2016 Olomouc
15. Gágyor, D., Pilka, R., Dzvinčuk, P., Študentová, M., Neubert, D.: Laparoskopická a robotická sakropexe – perioperační výsledky.
Gynekolog, Supplementum, s.17, XXVI. Česká Urogynekologie, Praha 7.12.2017,

Monografie (recenzovaná) – spoluautor

1. Pilka, R.: Robotická chirurgie v gynekologii, 2014, Maxdorf Jessenius, Praha, 177 s.ISBN:978-80-7345-398-5, spoluautor kapitoly: karcinom čípku děložního

15. Literatura

1. WHO, G., *Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. 2012; [http://globocan.iarc.fr/Pages\(fact_sheets_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages(fact_sheets_population.aspx)) (15th January 2016, date last accessed). 2016.
2. Amant, F., et al., *Endometrial cancer*. Lancet, 2005. **366**(9484): p. 491-505.
3. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
4. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(1): p. 7-30.
5. Arnett-Mansfield, R.L., et al., *Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium*. Cancer Res, 2001. **61**(11): p. 4576-82.
6. Ascher, S.M. and C. Reinhold, *Imaging of cancer of the endometrium*. Radiol Clin North Am, 2002. **40**(3): p. 563-76.
7. Lee, N.K., et al., *Prognostic factors for uterine cancer in reproductive-aged women*. Obstet Gynecol, 2007. **109**(3): p. 655-62.
8. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1983. **15**(1): p. 10-7.
9. Setiawan, V.W., et al., *Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors?* J Clin Oncol, 2013. **31**(20): p. 2607-18.
10. Parslov, M., et al., *Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **182**(1 Pt 1): p. 23-9.
11. Meyer, L.A., R.R. Broaddus, and K.H. Lu, *Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations*. Cancer Control, 2009. **16**(1): p. 14-22.
12. Hadravsky L., D.O., Michal M., *Lynch syndrome*
Copyright © 2010-2018 Bioptická laboratoř s.r.o., 2010.
13. Baird, D.T., et al., *Failure of estrogen-induced discharge of luteinizing hormone in lactating women*. J Clin Endocrinol Metab, 1979. **49**(4): p. 500-6.
14. Petrakis, N.L., et al., *Influence of pregnancy and lactation on serum and breast fluid estrogen levels: implications for breast cancer risk*. Int J Cancer, 1987. **40**(5): p. 587-91.
15. Zhan, B., et al., *Breastfeeding and the incidence of endometrial cancer: A meta-analysis*. Oncotarget, 2015. **6**(35): p. 38398-409.
16. Cibula, D., et al., *Hormonal contraception and risk of cancer*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(6): p. 631-50.
17. Uccella, S., et al., *Dietary and supplemental intake of one-carbon nutrients and the risk of type I and type II endometrial cancer: a prospective cohort study*. Ann Oncol, 2011. **22**(9): p. 2129-36.
18. Bakkum-Gamez, J.N., et al., *Current issues in the management of endometrial cancer*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(1): p. 97-112.
19. Manfredi, R., et al., *Local-regional staging of endometrial carcinoma: role of MR imaging in surgical planning*. Radiology, 2004. **231**(2): p. 372-8.
20. Barwick, T.D., et al., *Imaging of endometrial adenocarcinoma*. Clin Radiol, 2006. **61**(7): p. 545-55.
21. Alcazar, J.L., et al., *Transvaginal ultrasound for preoperative assessment of myometrial invasion in patients with endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2015. **46**(4): p. 405-13.

22. Christensen, J.W., et al., *Assessment of myometrial invasion in endometrial cancer using three-dimensional ultrasound and magnetic resonance imaging*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2016. **95**(1): p. 55-64.
23. Rose, P.G., *Endometrial carcinoma*. N Engl J Med, 1996. **335**(9): p. 640-9.
24. Salvesen, H.B., et al., *Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4834-9.
25. Creasman, W.T., et al., *Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study*. Cancer, 1987. **60**(8 Suppl): p. 2035-41.
26. Creutzberg, C.L., et al., *Outcome of high-risk stage IC, grade 3, compared with stage I endometrial carcinoma patients: the Postoperative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma Trial*. J Clin Oncol, 2004. **22**(7): p. 1234-41.
27. Morrow, C.P., et al., *Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 1991. **40**(1): p. 55-65.
28. Goff, B.A. and L.W. Rice, *Assessment of depth of myometrial invasion in endometrial adenocarcinoma*. Gynecol Oncol, 1990. **38**(1): p. 46-8.
29. Kucera, E., et al., *Accuracy of intraoperative frozen-section diagnosis in stage I endometrial adenocarcinoma*. Gynecol Obstet Invest, 2000. **49**(1): p. 62-6.
30. Wang, X., et al., *Clinical factors affecting the diagnostic accuracy of assessing dilation and curettage vs frozen section specimens for histologic grade and depth of myometrial invasion in endometrial carcinoma*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **201**(2): p. 194 e1-194 e10.
31. Mariani, A., et al., *High-risk endometrial cancer subgroups: candidates for target-based adjuvant therapy*. Gynecol Oncol, 2004. **95**(1): p. 120-6.
32. Benedetti Panici, P., et al., *Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(23): p. 1707-16.
33. group, A.s., et al., *Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study*. Lancet, 2009. **373**(9658): p. 125-36.
34. Sorosky, J.I., *Endometrial cancer*. Obstet Gynecol, 2008. **111**(2 Pt 1): p. 436-47.
35. Thomas, M., et al., *Surgical management and adjuvant therapy for patients with uterine clear cell carcinoma: a multi-institutional review*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(2): p. 293-7.
36. al., R.C.e., *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology; revised edition*. New York: Oxford university press, 2006. ISBN 0-19-852917-1.] 2006.
37. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
38. Dedes, K.J., et al., *Emerging therapeutic targets in endometrial cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(5): p. 261-71.
39. Lax, S.F., *Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification*. Virchows Arch, 2004. **444**(3): p. 213-23.
40. Mutter, G.L., et al., *Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(11): p. 924-30.
41. Mutter, G.L., et al., *Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium*. Cancer Res, 2001. **61**(11): p. 4311-4.
42. Kim, Y.B., et al., *Progesterin alone as primary treatment of endometrial carcinoma in premenopausal women. Report of seven cases and review of the literature*. Cancer, 1997. **79**(2): p. 320-7.

43. Lax, S.F., et al., *The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways*. *Cancer*, 2000. **88**(4): p. 814-24.
44. Scholten, A.N., et al., *Nuclear beta-catenin is a molecular feature of type I endometrial carcinoma*. *J Pathol*, 2003. **201**(3): p. 460-5.
45. Zheng, W., et al., *p53 overexpression and bcl-2 persistence in endometrial carcinoma: comparison of papillary serous and endometrioid subtypes*. *Gynecol Oncol*, 1996. **61**(2): p. 167-74.
46. Niederacher, D., et al., *Mutations and amplification of oncogenes in endometrial cancer*. *Oncology*, 1999. **56**(1): p. 59-65.
47. Saffari, B., et al., *Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: correlation with overall survival*. *Cancer Res*, 1995. **55**(23): p. 5693-8.
48. Salvesen, H.B., O.E. Iversen, and L.A. Akslen, *Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(5): p. 1382-90.
49. Iversen, O.E., *Flow cytometric deoxyribonucleic acid index: a prognostic factor in endometrial carcinoma*. *Am J Obstet Gynecol*, 1986. **155**(4): p. 770-6.
50. Susini, T., et al., *Ten-year results of a prospective study on the prognostic role of ploidy in endometrial carcinoma: dNA aneuploidy identifies high-risk cases among the so-called 'low-risk' patients with well and moderately differentiated tumors*. *Cancer*, 2007. **109**(5): p. 882-90.
51. Engelsens, I.B., et al., *GATA3 expression in estrogen receptor alpha-negative endometrial carcinomas identifies aggressive tumors with high proliferation and poor patient survival*. *Am J Obstet Gynecol*, 2008. **199**(5): p. 543 e1-7.
52. Kokka, F., et al., *Hormonal therapy in advanced or recurrent endometrial cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(12): p. CD007926.
53. Singh, M., et al., *Relationship of estrogen and progesterone receptors to clinical outcome in metastatic endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study*. *Gynecol Oncol*, 2007. **106**(2): p. 325-33.
54. Morrison, C., et al., *HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(15): p. 2376-85.
55. Oda, K., et al., *High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 10669-73.
56. Dutt, A., et al., *Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(25): p. 8713-7.
57. Risinger, J.I., et al., *PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(12): p. 3005-10.
58. Salvesen, H.B., et al., *PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma*. *Int J Cancer*, 2001. **91**(1): p. 22-6.
59. Jia, L., et al., *Endometrial glandular dysplasia with frequent p53 gene mutation: a genetic evidence supporting its precancer nature for endometrial serous carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(8): p. 2263-9.
60. Engelsens, I.B., et al., *Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas*. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **195**(4): p. 979-86.

61. Salvesen, H.B., S. Das, and L.A. Akslen, *Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 153-9.
62. Basil, J.B., et al., *Clinical significance of microsatellite instability in endometrial carcinoma*. Cancer, 2000. **89**(8): p. 1758-64.
63. MacDonald, N.D., et al., *Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1750-2.
64. Salvesen, H.B., et al., *Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(9): p. 3607-13.
65. Schlosshauer, P.W., et al., *Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma*. Mod Pathol, 2000. **13**(10): p. 1066-71.
66. Stefansson, I.M., H.B. Salvesen, and L.A. Akslen, *Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(7): p. 1242-52.
67. Moreno-Bueno, G., et al., *Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia*. J Pathol, 2003. **199**(4): p. 471-8.
68. Bachmann, I.M., et al., *EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast*. J Clin Oncol, 2006. **24**(2): p. 268-73.
69. Ginath, S., et al., *Tissue and serum CA125 expression in endometrial cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2002. **12**(4): p. 372-5.
70. Chung, H.H., et al., *Use of preoperative serum CA-125 levels for prediction of lymph node metastasis and prognosis in endometrial cancer*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2006. **85**(12): p. 1501-5.
71. Powell, J.L., et al., *Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer*. J Reprod Med, 2005. **50**(8): p. 585-90.
72. Duk, J.M., et al., *CA 125: a useful marker in endometrial carcinoma*. Am J Obstet Gynecol, 1986. **155**(5): p. 1097-102.
73. Niloff, J.M., et al., *Elevation of serum CA125 in carcinomas of the fallopian tube, endometrium, and endocervix*. Am J Obstet Gynecol, 1984. **148**(8): p. 1057-8.
74. Santala, M., A. Talvensaaari-Mattila, and A. Kauppila, *Peritoneal cytology and preoperative serum CA 125 level are important prognostic indicators of overall survival in advanced endometrial cancer*. Anticancer Res, 2003. **23**(3C): p. 3097-103.
75. Sood, A.K., et al., *Value of preoperative CA 125 level in the management of uterine cancer and prediction of clinical outcome*. Obstet Gynecol, 1997. **90**(3): p. 441-7.
76. Kotowicz, B., et al., *The value of tumor marker and cytokine analysis for the assessment of regional lymph node status in cervical cancer patients*. Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(6): p. 1279-84.
77. Moore, R.G., et al., *Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(2): p. 196-201.
78. Chovanec, J., et al., *Adjustment of serum HE4 to reduced glomerular filtration and its use in biomarker-based prediction of deep myometrial invasion in endometrial cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(64): p. 108213-108222.
79. Angioli, R., et al., *The role of novel biomarker HE4 in endometrial cancer: a case control prospective study*. Tumour Biol, 2013. **34**(1): p. 571-6.

80. Antonsen, S.L., et al., *HE4 and CA125 levels in the preoperative assessment of endometrial cancer patients: a prospective multicenter study (ENDOMET)*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2013. **92**(11): p. 1313-22.
81. Bignotti, E., et al., *Diagnostic and prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients*. Br J Cancer, 2011. **104**(9): p. 1418-25.
82. Saarelainen, S.K., et al., *Predictive value of serum human epididymis protein 4 and cancer antigen 125 concentrations in endometrial carcinoma*. Am J Obstet Gynecol, 2013. **209**(2): p. 142 e1-6.
83. Mutz-Dehbalaiie, I., et al., *HE4 is an independent prognostic marker in endometrial cancer patients*. Gynecol Oncol, 2012. **126**(2): p. 186-91.
84. Scambia, G., et al., *Combined use of CA 125 and CA 15-3 in patients with endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1994. **54**(3): p. 292-7.
85. Sivridis, E., *Angiogenesis and endometrial cancer*. Anticancer Res, 2001. **21**(6B): p. 4383-8.
86. Dobrzycka, B., et al., *Prognostic significance of VEGF and its receptors in endometrioid endometrial cancer*. Ginekol Pol, 2010. **81**(6): p. 422-5.
87. Fine, B.A., et al., *VEGF, flt-1, and KDR/flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 2000. **76**(1): p. 33-9.
88. Maae, E., et al., *Prognostic impact of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor A in patients with breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **133**(1): p. 257-65.
89. Sung, C.Y., et al., *Expression of placenta growth factor in colorectal carcinomas*. J Korean Soc Coloproctol, 2012. **28**(6): p. 315-20.
90. Coenegrachts, L., et al., *Increased expression of placental growth factor in high-grade endometrial carcinoma*. Oncol Rep, 2013. **29**(2): p. 413-8.
91. Chudecka-Glaz, A.M., et al., *Serum HE4, CA125, YKL-40, bcl-2, cathepsin-L and prediction optimal debulking surgery, response to chemotherapy in ovarian cancer*. J Ovarian Res, 2014. **7**: p. 62.
92. Johansen, J.S., et al., *Serum YKL-40 in risk assessment for colorectal cancer: a prospective study of 4,496 subjects at risk of colorectal cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2015. **24**(3): p. 621-6.
93. Lugowska, I., et al., *Serum markers in early-stage and locally advanced melanoma*. Tumour Biol, 2015. **36**(11): p. 8277-85.
94. Xu, C.H., L.K. Yu, and K.K. Hao, *Serum YKL-40 level is associated with the chemotherapy response and prognosis of patients with small cell lung cancer*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96384.
95. Yamac, D., et al., *Serum YKL-40 levels as a prognostic factor in patients with locally advanced breast cancer*. Adv Ther, 2008. **25**(8): p. 801-9.
96. Peng, C., et al., *YKL-40 protein levels and clinical outcome of human endometrial cancer*. J Int Med Res, 2010. **38**(4): p. 1448-57.
97. Kotowicz, B., et al., *Preoperative serum levels of YKL 40 and CA125 as a prognostic indicators in patients with endometrial cancer*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2017. **215**: p. 141-147.
98. Dewailly, D., et al., *The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(3): p. 370-85.
99. Fleming, R., et al., *Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Mullerian hormone*. Reprod Biomed Online, 2015. **31**(4): p. 486-96.
100. Garg, D. and R. Tal, *The role of AMH in the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome*. Reprod Biomed Online, 2016. **33**(1): p. 15-28.

101. Geerts, I., et al., *The role of inhibins B and antimullerian hormone for diagnosis and follow-up of granulosa cell tumors*. Int J Gynecol Cancer, 2009. **19**(5): p. 847-55.
102. Kim, J.H., D.T. MacLaughlin, and P.K. Donahoe, *Mullerian inhibiting substance/anti-Mullerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors*. Obstet Gynecol Sci, 2014. **57**(5): p. 343-57.
103. Fortner, R.T., et al., *Anti-Mullerian hormone and endometrial cancer: a multi-cohort study*. Br J Cancer, 2017. **117**(9): p. 1412-1418.
104. Kawate, T., et al., *High levels of DJ-1 protein and isoelectric point 6.3 isoform in sera of breast cancer patients*. Cancer Sci, 2015. **106**(7): p. 938-43.
105. Xu, S., et al., *DJ-1 Is Upregulated in Oral Squamous Cell Carcinoma and Promotes Oral Cancer Cell Proliferation and Invasion*. J Cancer, 2016. **7**(8): p. 1020-8.
106. Lin, J.P., et al., *DJ-1 is activated in medulloblastoma and is associated with cell proliferation and differentiation*. World J Surg Oncol, 2014. **12**: p. 373.
107. Shu, K., et al., *Expression of DJ-1 in endometrial cancer: close correlation with clinicopathological features and apoptosis*. Int J Gynecol Cancer, 2013. **23**(6): p. 1029-35.
108. Moore, B.W., *A soluble protein characteristic of the nervous system*. Biochem Biophys Res Commun, 1965. **19**(6): p. 739-44.
109. Santamaria-Kisiel, L., A.C. Rintala-Dempsey, and G.S. Shaw, *Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family*. Biochem J, 2006. **396**(2): p. 201-14.
110. Donato, R., *Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1450**(3): p. 191-231.
111. Donato, R., *S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(7): p. 637-68.
112. Donato, R., *Intracellular and extracellular roles of S100 proteins*. Microsc Res Tech, 2003. **60**(6): p. 540-51.
113. Heizmann, C.W., G. Fritz, and B.W. Schafer, *S100 proteins: structure, functions and pathology*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1356-68.
114. Leclerc, E., et al., *Binding of S100 proteins to RAGE: an update*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(6): p. 993-1007.
115. Salama, I., et al., *A review of the S100 proteins in cancer*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(4): p. 357-64.
116. Moubayed, N., et al., *Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours*. J Cancer Res Clin Oncol, 2007. **133**(4): p. 253-61.
117. Ohuchida, K., et al., *Over-expression of S100A2 in pancreatic cancer correlates with progression and poor prognosis*. J Pathol, 2007. **213**(3): p. 275-82.
118. Ohuchida, K., et al., *S100A6 is increased in a stepwise manner during pancreatic carcinogenesis: clinical value of expression analysis in 98 pancreatic juice samples*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(4): p. 649-54.
119. Wang, G., et al., *Colorectal cancer progression correlates with upregulation of S100A11 expression in tumor tissues*. Int J Colorectal Dis, 2008. **23**(7): p. 675-82.
120. Yang, Y.Q., et al., *Upregulated expression of S100A6 in human gastric cancer*. J Dig Dis, 2007. **8**(4): p. 186-93.
121. Yao, R., et al., *The S100 proteins for screening and prognostic grading of bladder cancer*. Histol Histopathol, 2007. **22**(9): p. 1025-32.
122. Zhang, H., et al., *Selective expression of S100A7 in lung squamous cell carcinomas and large cell carcinomas but not in adenocarcinomas and small cell carcinomas*. Thorax, 2008. **63**(4): p. 352-9.

123. Emberley, E.D., et al., *The S100A7-c-Jun activation domain binding protein 1 pathway enhances prosurvival pathways in breast cancer*. *Cancer Res*, 2005. **65**(13): p. 5696-702.
124. Fernandez-Fernandez, M.R., T.J. Rutherford, and A.R. Fersht, *Members of the S100 family bind p53 in two distinct ways*. *Protein Sci*, 2008. **17**(10): p. 1663-70.
125. Kennedy, R.D., et al., *BRCA1 and c-Myc associate to transcriptionally repress psoriasis, a DNA damage-inducible gene*. *Cancer Res*, 2005. **65**(22): p. 10265-72.
126. Slomnicki, L.P., B. Nawrot, and W. Lesniak, *S100A6 binds p53 and affects its activity*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(4): p. 784-90.
127. van Dieck, J., et al., *Modulation of the oligomerization state of p53 by differential binding of proteins of the S100 family to p53 monomers and tetramers*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(20): p. 13804-11.
128. DeSouza, L., et al., *Proteomic analysis of the proliferative and secretory phases of the human endometrium: protein identification and differential protein expression*. *Proteomics*, 2005. **5**(1): p. 270-81.
129. Kanamori, T., et al., *Increased expression of calcium-binding protein S100 in human uterine smooth muscle tumours*. *Mol Hum Reprod*, 2004. **10**(10): p. 735-42.
130. Zech, V.F., et al., *Prognostic and diagnostic relevance of hnRNP A2/B1, hnRNP B1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer*. *Cancer Detect Prev*, 2006. **30**(5): p. 395-402.
131. Cancemi, P., et al., *Large-scale proteomic identification of S100 proteins in breast cancer tissues*. *BMC Cancer*, 2010. **10**: p. 476.
132. Utans, U., et al., *Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(6): p. 2954-62.
133. Utans, U., et al., *Allograft inflammatory factor-1. A cytokine-responsive macrophage molecule expressed in transplanted human hearts*. *Transplantation*, 1996. **61**(9): p. 1387-92.
134. Chen, Z.W., et al., *Identification, isolation, and characterization of daintain (allograft inflammatory factor 1), a macrophage polypeptide with effects on insulin secretion and abundantly present in the pancreas of prediabetic BB rats*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 13879-84.
135. Liu, G., et al., *Allograft inflammatory factor-1 and its immune regulation*. *Autoimmunity*, 2007. **40**(2): p. 95-102.
136. Imai, Y., et al., *A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **224**(3): p. 855-62.
137. Tanaka, S., et al., *Upregulation of a new microglial gene, *mrf-1*, in response to programmed neuronal cell death and degeneration*. *J Neurosci*, 1998. **18**(16): p. 6358-69.
138. Deininger, M.H., R. Meyermann, and H.J. Schluesener, *The allograft inflammatory factor-1 family of proteins*. *FEBS Lett*, 2002. **514**(2-3): p. 115-21.
139. Iris, F.J., et al., *Dense Alu clustering and a potential new member of the NF kappa B family within a 90 kilobase HLA class III segment*. *Nat Genet*, 1993. **3**(2): p. 137-45.
140. Autieri, M.V., *cDNA cloning of human allograft inflammatory factor-1: tissue distribution, cytokine induction, and mRNA expression in injured rat carotid arteries*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **228**(1): p. 29-37.
141. Kohler, C., *Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis*. *Cell Tissue Res*, 2007. **330**(2): p. 291-302.

142. Watano, K., et al., *Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line*. Immunology, 2001. **104**(3): p. 307-16.
143. X.Y. Zhao, Z.W.C., *Daintain invokes oxidative stress in blood*. J.Southwest Univ. Nationalities 37 422-424. 2011.
144. Y.Y.Zhao, J.H.W., Z.W. Chen, *Macrophage cytokine daintain stimulates inflammatory reaction in the blood*. Nat. Prod. Res. Dev. 23 (425-427). 2011.
145. Pashenkov, M., et al., *Augmented expression of daintain/allograft inflammatory factor-1 is associated with clinical disease: dynamics of daintain/allograft inflammatory factor-1 expression in spleen, peripheral nerves and sera during experimental autoimmune neuritis*. Scand J Immunol, 2000. **52**(2): p. 117-22.
146. Deininger, M.H., et al., *Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas*. Acta Neuropathol, 2000. **100**(6): p. 673-80.
147. Jia, J., et al., *Expression of allograft inflammatory factor-1 and CD68 in haemangioma: implication in the progression of haemangioma*. Br J Dermatol, 2008. **159**(4): p. 811-9.
148. Jia, J., et al., *Overexpression of allograft inflammatory factor-1 promotes the proliferation and migration of human endothelial cells (HUV-EC-C) probably by up-regulation of basic fibroblast growth factor*. Pediatr Res, 2010. **67**(1): p. 29-34.
149. Li, T., et al., *Daintain/AIF-1 promotes breast cancer cell migration by up-regulated TNF-alpha via activate p38 MAPK signaling pathway*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **131**(3): p. 891-8.
150. Liu, S., et al., *Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF-kappaB/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth*. Cancer Sci, 2008. **99**(5): p. 952-7.
151. Seib, T., et al., *The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3*. Genomics, 1997. **40**(1): p. 200-2.
152. Hoffmann, W., *A new repetitive protein from Xenopus laevis skin highly homologous to pancreatic spasmolytic polypeptide*. J Biol Chem, 1988. **263**(16): p. 7686-90.
153. Hanby, A.M., et al., *The expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in 'gastric metaplasia' of the proximal duodenum: implications for the nature of 'gastric metaplasia'*. J Pathol, 1993. **169**(3): p. 355-60.
154. Hanby, A.M., et al., *Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach*. Gastroenterology, 1993. **105**(4): p. 1110-6.
155. Podolsky, D.K., et al., *Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6694-702.
156. Rio, M.C., et al., *Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa*. Science, 1988. **241**(4866): p. 705-8.
157. Tomasetto, C., et al., *hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma*. EMBO J, 1990. **9**(2): p. 407-14.
158. Jorgensen, K.H., L. Thim, and H.E. Jacobsen, *Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas*. Regul Pept, 1982. **3**(3-4): p. 207-19.
159. Playford, R.J., et al., *Human spasmolytic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration*. Gastroenterology, 1995. **108**(1): p. 108-16.

160. Hauser, F., et al., *hPI.B, a human P-domain peptide homologous with rat intestinal trefoil factor, is expressed also in the ulcer-associated cell lineage and the uterus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 6961-5.
161. Piggott, N.H., et al., *Antipeptide antibodies against the pNR-2 oestrogen-regulated protein of human breast cancer cells and detection of pNR-2 expression in normal tissues by immunohistochemistry.* J Pathol, 1991. **163**(2): p. 95-104.
162. Poulsom, R., et al., *Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium.* J Pathol, 1997. **183**(1): p. 30-8.
163. Probst, J.C., et al., *Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide.* FASEB J, 1996. **10**(13): p. 1518-23.
164. Kindon, H., et al., *Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein.* Gastroenterology, 1995. **109**(2): p. 516-23.
165. Engel, E., et al., *Barrier function of the gastric mucus gel.* Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 1): p. G994-9.
166. Chinery, R. and H.M. Cox, *Modulation of epidermal growth factor effects on epithelial ion transport by intestinal trefoil factor.* Br J Pharmacol, 1995. **115**(1): p. 77-80.
167. Dignass, A., et al., *Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway.* J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 376-83.
168. Playford, R.J., et al., *Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 2137-42.
169. Mashimo, H., et al., *Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor.* Science, 1996. **274**(5285): p. 262-5.
170. Lacy, E.R., G.P. Morris, and M.M. Cohen, *Rapid repair of the surface epithelium in human gastric mucosa after acute superficial injury.* J Clin Gastroenterol, 1993. **17 Suppl 1**: p. S125-35.
171. Bonkhoff, H., et al., *Differential expression of the pS2 protein in the human prostate and prostate cancer: association with premalignant changes and neuroendocrine differentiation.* Hum Pathol, 1995. **26**(8): p. 824-8.
172. Henry, J.A., et al., *Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours.* Br J Cancer, 1991. **64**(4): p. 677-82.
173. Cappelletti, V., et al., *Prognostic relevance of pS2 status in association with steroid receptor status and proliferative activity in node-negative breast cancer.* Eur J Cancer, 1992. **28A**(8-9): p. 1315-8.
174. Foekens, J.A., et al., *Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status.* Cancer Res, 1990. **50**(13): p. 3832-7.
175. Neubert, D., et al., *[The role of trefoil factor family in gynecological disease].* Ceska Gynekol. **81**(6): p. 444-450.
176. Mhawech, P., et al., *Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation.* Mod Pathol, 2005. **18**(3): p. 340-8.
177. Mhawech-Fauceglia, P., et al., *ER+ /PR+ /TFF3+ /IMP3- immunoprofile distinguishes endometrioid from serous and clear cell carcinomas of the endometrium: a study of 401 cases.* Histopathology, 2013. **62**(7): p. 976-85.
178. Urbanek, L., et al., *Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in*

- human serum using monolithic column and diode-array detection.* Anal Chim Acta, 2006. **573-574**: p. 267-72.
179. Solichova, D., et al., *Development and validation of HPLC method for the determination of alpha-tocopherol in human erythrocytes for clinical applications.* Anal Bioanal Chem, 2003. **376**(4): p. 444-7.
 180. Zezulova, M., et al., *Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation.* Clin Chem Lab Med, 2016. **54**(2): p. 305-14.
 181. Melichar, B., *Laboratory medicine and medical oncology: the tale of two Cinderellas.* Clin Chem Lab Med, 2013. **51**(1): p. 99-112.
 182. Suemori, S., K. Lynch-Devaney, and D.K. Podolsky, *Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11017-21.
 183. Pallud, C., et al., *Immunohistochemistry of pS2 in normal human breast and in various histological forms of breast tumours.* Histopathology, 1993. **23**(3): p. 249-56.
 184. Higashiyama, M., et al., *Estimation of serum level of pS2 protein in patients with lung adenocarcinoma.* Anticancer Res, 1996. **16**(4B): p. 2351-5.
 185. Poulsen, S.S., et al., *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, 1999. **45**(4): p. 516-22.
 186. Fox, J.G., et al., *Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 -/- C57BL6 x Sv129 Helicobacter pylori-infected mice.* Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1520-8.
 187. Yamaguchi, J., et al., *Loss of Trefoil Factor 2 From Pancreatic Duct Glands Promotes Formation of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms in Mice.* Gastroenterology, 2016. **151**(6): p. 1232-1244 e10.
 188. Ishibashi, Y., et al., *Serum TFF1 and TFF3 but not TFF2 are higher in women with breast cancer than in women without breast cancer.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4846.
 189. Maxwell, G.L., et al., *Microarray analysis of endometrial carcinomas and mixed mullerian tumors reveals distinct gene expression profiles associated with different histologic types of uterine cancer.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(11): p. 4056-66.
 190. Risinger, J.I., et al., *Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer.* Cancer Res, 2003. **63**(1): p. 6-11.
 191. Bignotti, E., et al., *Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas.* Br J Cancer, 2008. **99**(5): p. 768-73.
 192. May, F.E. and B.R. Westley, *Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells.* J Pathol, 1997. **182**(4): p. 404-13.
 193. Vestergaard, E.M., et al., *Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3.* Clin Chem, 2002. **48**(10): p. 1689-95.
 194. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
 195. Freedman, R.S., et al., *Pilot study of Flt3 ligand comparing intraperitoneal with subcutaneous routes on hematologic and immunologic responses in patients with peritoneal carcinomatosis and mesotheliomas.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(14): p. 5228-37.
 196. Melichar, B. and R.S. Freedman, *Immunology of the peritoneal cavity: relevance for host-tumor relation.* Int J Gynecol Cancer, 2002. **12**(1): p. 3-17.

197. Melichar, B., et al., *Increased urinary neopterin in acute myocardial infarction*. Clin Chem, 1994. **40**(2): p. 338-9.
198. Solichova, D., et al., *Biochemical profile and survival in nonagenarians*. Clin Biochem, 2001. **34**(7): p. 563-9.
199. Melichar, B., D. Solichova, and R.S. Freedman, *Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies*. Int J Gynecol Cancer, 2006. **16**(1): p. 240-52.
200. Melichar, B., et al., *Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma*. Int J Biol Markers, 2006. **21**(3): p. 190-8.
201. Melichar, B., et al., *Mitogen-induced lymphocyte proliferation and systemic immune activation in cancer patients*. Tumori, 1996. **82**(3): p. 218-20.
202. Melichar, B., et al., *Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis*. Clin Exp Immunol, 2000. **119**(1): p. 19-27.
203. Melichar, B., et al., *CD4+ T-lymphocytopenia and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumours*. Scand J Clin Lab Invest, 2001. **61**(5): p. 363-70.
204. Melichar, B., et al., *Growth inhibitory effects of aromatic fatty acids on ovarian tumor cell lines*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(12): p. 3069-76.
205. Friberg, M., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection*. Int J Cancer, 2002. **101**(2): p. 151-5.
206. Melichar, B., et al., *Intestinal permeability in patients with chemotherapy-induced stomatitis*. J Cancer Res Clin Oncol, 2001. **127**(5): p. 314-8.
207. Melichar, B. and I. Nemcova, *Eye complications of cetuximab therapy*. Eur J Cancer Care (Engl), 2007. **16**(5): p. 439-43.
208. Poprach, A., et al., *Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: a national registry-based study*. Ann Oncol, 2012. **23**(12): p. 3137-43.

16. Přílohy

1. Návrh grantového projektu: Využití nových laboratorních ukazatelů v diagnostice patologií endometria, 2015, registrační číslo 15-31564A
2. Návrh grantového projektu: Využití nových laboratorních ukazatelů v diagnostice a léčbě patologií endometria, 2016, registrační číslo 16-31875A
3. Informovaný souhlas
4. Publikace – přehledový článek v recenzovaném časopise
Neubert, D., Pilka, R., Stejskal, D., Krejčí, G.: Význam trifolátů u gynekologických onemocnění, Česká Gynekologie, 2016, 6, s 444-450
5. Publikace – původní vědecká publikace v časopise s IF
Pilka, R., Marek, R., Adam, T., Kudela, M., Ondrová, D., Neubert, D., Hambálek, J., Maděrka, M., Solichová, D., Kujovská Krčmová, L., Melichar, B. : Systematic inflammatory response after open, laparoscopic and robotic Surgery in endometrial cancer patients. Anticancer research, 2016, 36:2909-2922
6. Publikace – původní vědecká publikace v časopise s IF
Pilka, R., Neubert, D., Stejskal, D., Krejčí, G., Švesták, M., Marek, R., Adam, T., Sobková, K., Ondrová, D., Hambálek, J., Maděrka, M., Solichová, D., Kujovská Krčmová, L., Javorská, L., Melichar, B.: Serum concentrations of TFF3, S100-A11 a AIF-1 in association with systematic inflammatory response, disease stage and nodal involvement in endometrial cancer, Pteridines 2018, 29(1), 1-7
7. Publikace – původní vědecký článek v recenzovaném časopise
Neubert, D., Pilka, R., Ondrová, D., Hambálek, J., Maděrka, M., Sobková, K., Stejskal, D., Krejčí, G.: Elevace hladin TFF3 u karcinomu endometria, Česká Gynekologie, 2018

PŘÍLOHA Č. 1

Návrh grantového projektu: Využití nových laboratorních ukazatelů v diagnostice patologií endometria, registrační číslo 15-31564A

Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky

Část A

Žádost o udělení účelové podpory (dále návrh projektu)

Veřejná soutěž v rámci Programu na podporu zdravotnického aplikovaného výzkumu a vývoje na léta 2015 – 2022

Datum podání návrhu projektu: **totožné s datem odeslání návrhu projektu prostřednictvím ISDS**Číslo panelu(ů): **P03****P07** Předmětem výzkumu v navrhovaném projektu jsou jak nádorová onemocnění (karcinom těla děložního), tak onemocnění endometriózou

Dílčí cíl priority Zdravá populace
1.3.1. - Nádorová biologie ve vztahu k diagnostickým a terapeutickým cílům
1.3.2. - Analýza vztahů hostitel-nádor jako prostředek individualizace diagnostiky a léčby
1.7.1. - Onemocnění vznikající prenatálně, perinatálně a v raném dětském věku

Registrační číslo: **15-31564A**

Uchazeč a navrhovatel

Uchazeč:	Fakultní nemocnice Olomouc
IČ:	00098892
Sídlo:	I. P. Pavlova 6 , Olomouc
Navrhovatel:	prof. MUDr. Radovan Pilka Ph.D.
Datum narození/rodné číslo:	1964-12-03 641203/0812
Telefon:	588 444 103
Fax:	
E-mail:	radovan.pilka@fnol.cz

Spoluuchazeč a spolunavrhovatel 1

Spoluuchazeč:	Univerzita Palackého v Olomouci Lékařská fakulta
IČ:	61989592
Sídlo:	Křížkovského 511/8, Olomouc
Spolunavrhovatel:	Prof. MUDr. David Stejskal Ph.D.
Datum narození/rodné číslo:	1967-06-03 670603/0265
Telefon:	588 444 103
Fax:	
E-mail:	david.stejskal@nemsne.cz

Název projektu česky:

Využití nových laboratorních ukazatelů v diagnostice patologií endometria

Název projektu anglicky:

New laboratory parameters in endometrial pathology diagnosis

Klíčová slova česky:

Calgirazzin, A 100A11, TFF, endometrium, endometriosis, endometrial cancer ,biomarkers

Klíčová slova anglicky:

Calgirazzin, A 100A11, TFF, endometrium, endometriosis, endometrial cancer ,biomarkers

Datum zahájení: **2015-05-01**

Doba řešení (v letech): **4**

Zařazení do číselníku CEP:

FK

Podáním návrhu projektu uchazeč stvrzuje, že:

- navrhovatel je v pracovněprávním poměru k uchazeči nebo tento vztah vznikne nejpozději ke dni zahájení řešení projektu;
- zavazuje se, že po uzavření smlouvy o podpoře projektu bude plnit všechny povinnosti příjemce vyplývající ze zákona č. 130/2002 Sb., zadávací dokumentace a uzavřené smlouvy nebo vydaného rozhodnutí o poskytnutí podpory;
- zajistí, aby řešitel po uzavření smlouvy o podpoře projektu plnil všechny své povinnosti, zejména odpovídal za odbornou úroveň řešení projektu; nastane-li situace, že podmínky na straně řešitele či příjemce znemožní řešiteli pokračovat v řešení projektu v navrhovaném termínu a nedojde-li k ukončení projektu, příjemce zajistí se souhlasem poskytovatele jiného řešitele, pokračování řešení projektu a jeho dokončení v souladu s uzavřenou smlouvou;
- všechny údaje uvedené v návrhu projektu jsou pravdivé, úplné a nezkrácené a jsou totožné s údaji vloženými do návrhu projektu pomocí aplikace, a že návrh projektu byl vypracován v souladu se zadávací dokumentací;
- navrhovatel, všichni spoluuchazeči, spolunavrhovatelé a odborní i další spolupracovníci uvedení v návrhu projektu byli seznámeni s věcným obsahem návrhu projektu i s finančními požadavky v něm uvedenými a se zadávací dokumentací;
- před podáním návrhu projektu zajistil souhlas výše uvedených osob s účastí na řešení projektu uvedeného v návrhu projektu;
- na jiný projekt s totožnou nebo obdobnou problematikou nepřijal, nepřijímá a nepřijme podporu z jiného zdroje;
- obsah návrhu projektu, jehož se v jiných grantových nebo programových projektech účastní stejný navrhovatel nebo spolunavrhovatel je rozdílný od tohoto návrhu projektu a navržené rozsahy prací umožní navrhovateli nebo spolunavrhovateli řešit všechny jejich projekty;
- souhlasí, aby údaje uvedené v návrhu projektu byly použity pro vnitřní informační systém poskytovatele a uveřejněny v rozsahu stanoveném zákonem č. 130/2002 Sb. a zadávací dokumentací;
- v případě uzavření smlouvy nebo vydání rozhodnutí o poskytnutí podpory na řešení projektu se bude při jeho řešení řídit podmínkami pro řešení projektů uvedenými v Příloze 8 zadávací dokumentace.

Kopie speciálních oprávnění podle zvláštního právního předpisu (viz § 18 odst. (2) písm. b) zákona č. 130/2002 Sb.) jsou přiloženy, zahrnuje-li projekt činnosti je vyžadující.

Uchazeč bere na vědomí, že zaslání jiné než FINAL verze dokumentu bude důvodem k vyřazení návrhu projektu z veřejné soutěže.

Pro vyhodnocení návrhu bude do soutěže přijata pouze poslední verze návrhu projektu, která bude doručena do Datové schránky GAČR vyhrazené pro systém GRIS (ID Datové schránky: ntq92qs) v řádném termínu soutěže. Uchazeč potvrzuje, že byla zkontrolována úplnost a správnost údajů.

Statutární zástupce uchazeče

2nd year 2016

Prof.Pilka, MUDr.Huml - indications to and performance of surgery, enrollment of patients into study, preparation of reports, preparation of publications

MUDr.Neubert, MUDr.Ondrová, MUDr.Horváthová - surgery, data collection

Prof.Stejskal, - laboratory examinations, Prostějov

3rd year 2017

Prof.Pilka, MUDr.Huml - indications to and performance of surgery, enrollment of patients into study, preparation of reports, preparation of publications

MUDr.Neubert, MUDr.Ondrová, MUDr.Horváthová - surgery, data collection

Prof.Stejskal, - laboratory examinations, Prostějov

4th year 2018

Prof.Pilka, MUDr.Huml - indications to and performance of surgery, enrollment of patients into

study, preparation of reports, preparation of publications, final report

MUDr.Neubert, MUDr.Ondrová, MUDr.Horváthová - surgery, data collection

Prof.Stejskal, - laboratory examinations, Prostějov

Statistical evaluation

Results will be evaluated in absolute and percentage figures comparing day - 1 till +5.

Normality will be tested by Shapiro-Wilk test. In the case of normal distribution ANOVA test will be used, if not, non-parametric Kruskal-Wallis test and post-hoc Wilcoxonův test with Bonferroni's significance corrections will be used. Statistical evaluation will be done by SPSS software.

Collaboration

The project suggest collaboration of Department of Obstetrics and Gynecology, University hospital Olomouc and Department of Laboratory Medicine, Hospital Prostějov. Laboratory in Prostějov is the only facility in the Czech Republic capable to analyze S 100A11-Calgizzarin, TFF 1-3 and AIF-1 in blood samples.

Discussion

Abnormal endometrial findings are very common in women with perimenopausal bleeding. The most significant one being endometrial cancer. At present there is no reliable biomarker for early diagnosis of endometrial pathology.

Endometriosis is characterised by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. Typical symptoms include dysmenorrhoea, dyspareunia, pelvic pain and infertility.

Approximately 5-15% of women in reproductive age have been shown to suffer from endometriosis. Diagnosis relies on surgery. The predominant method of treatment is surgery with possible serious complications, when performed in advanced stages of disease. At present there is no marker for early diagnosis and follow-up of endometriosis.

Endometrial cancer is after the breast cancer the second most prevalent female cancer in the Czech republic. The prognosis of early stages is very good, but definitive staging depends on radical surgery. At present there is no marker for diagnosis, prognosis and follow up of this disease.

Calgizzarin (S 100A11), TFF 1-3 and AIF-1 are proteins which play important role not only in physiology but in cancerogenesis as well.

PŘÍLOHA Č. 2

Návrh grantového projektu: Využití nových laboratorních ukazatelů v diagnostice patologií endometria, registrační číslo 16-31875A



A - Základní údaje

Žádost o udělení účelové podpory (dále jen návrh projektu)

Registrační číslo	16-31875A	Doba řešení (v letech)	4
Datum zahájení	1.4.2016		
Název projektu česky	Využití nových laboratorních ukazatelů v diagnostice a léčbě patologií endometria		
Název projektu anglicky	New laboratory markers in endometrial pathology diagnosis and treatment		
Hlavní panel	P07 - Věkově specifické skupiny chorob		
Klíčová slova	Calgirazzin; TFF; Endometrium; endometrióza; endometrální karcinom; biomarkery		
Klíčová slova anglicky	Calgirazzin; TFF; Endometrium; endometriosis; endometrial cancer; biomarkers		

Navrhovatel a uchazeč

Jméno a příjmení	prof. MUDr. Radovan Pilka Ph.D.	Rodné číslo	641203/0812
E-mail	radovan.pilka@fnol.cz	Telefon	588 444 103
Organizace	Fakultní nemocnice Olomouc		
Sídlo	I. P. Pavlova 6/95, Olomouc	IČO	00098892

Spolunavrhovatel a spoluuchazeč - 1

Jméno a příjmení	Prof. MUDr. David Stejskal Ph.D., MBA	Rodné číslo	670603/0265
E-mail	david.stejskal@nemsne.cz	Telefon	588 444 103
Organizace	Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta		
Sídlo	Křížkovského 511/8, Olomouc	IČO	61989592

Hypothesis

S 100A11-Calgizzarin, TTF 3 and AIF-1 are elevated in endometrial pathologies.

Material and methods

Every year patients with perimenopausal bleeding (approx. 400) will have performed hysteroscopy. According to the final histopathology the patients will be subdivided into groups with benign fading (50), precancerous (50) and cancerous lesions. Blood samples will be taken during the procedure. In patients with endometrial cancer (50) second blood sample will be taken during the radical surgery. Similarly, the blood sample will be taken during surgery in patients with endometriosis (50). Control group will consist of patients operated for benign disease (myoma) (50).

In this project Calgizzarin (S100A 11), Trefoil factor 3 (TFF3) and Allograft inflammatory factor 1 (AIF-1) will be tested in blood samples.

At the same time all patients will be tested for Ca 125 (Immulite, Siemens, USA) and CEA (Immulite, Siemens, USA). In all patients blood count, CRP, creatinin, ALT, bilirubin, AST, Na, K and Cl will be examined to exclude secondary pathologies.

Time schedule

150 patients will be enrolled into the study group and 100 patients into the control group.

1st year (2015)

Prof.Pilka, MUDr.Huml - indications to and performance of surgery, enrollment of patients into study, preparation of reports

MUDr. Neubert, MUDr.Ondrová, MUDr.Horváthová - surgery, data collection

Prof.Stejskal, - laboratory examinations, Prostějov

2nd year 2016

Prof.Pilka, MUDr.Huml - indications to and performance of surgery, enrollment of patients into study, preparation of reports, preparation of publications

MUDr. Neubert, MUDr.Ondrová, MUDr.Horváthová - surgery, data collection

Prof.Stejskal, - laboratory examinations, Prostějov

3rd year 2017

Prof.Pilka, MUDr.Huml - indications to and performance of surgery, enrollment of patients into study, preparation of reports, preparation of publications

MUDr. Neubert, MUDr.Ondrová, MUDr.Horváthová - surgery, data collection

Prof.Stejskal, - laboratory examinations, Prostějov

4th year 2018

Prof.Pilka, MUDr.Huml - indications to and performance of surgery, enrollment of patients into study, preparation of reports, preparation of publications

MUDr. Neubert, MUDr.Ondrová, MUDr.Horváthová - surgery, data collection

Prof.Stejskal, - laboratory examinations, Prostějov

5th year 2019

Prof.Pilka, MUDr.Huml - indications to and performance of surgery, enrollment of patients into study, preparation of reports, preparation of publications, final report

MUDr. Neubert, MUDr.Ondrová, MUDr.Horváthová - surgery, data collection

Prof.Stejskal, - laboratory examinations, Prostějov

PŘÍLOHA Č. 3

Informovaný souhlas

Vážená paní,

Pro účinnou léčbu nádorových onemocnění je nutno získat maximum informací o charakteru zhoubného nádoru. Jednou z nových možností je stanovení Calgizzarinu (S 100A11), TFF 1-3 a AIF-1, tj. látek, které by měly podat informace o charakteru nádoru a jeho vlastnostech. Obdobným způsobem chceme sledovat tyto látky i u onemocnění endometriozou. Uvedené látky budeme stanovovat z krevního vzorku, který budeme odebírat a následně vyšetřovat v době první, event. druhé operace a po provedené operační léčbě. Dosavadní zprávy v odborné literatuře i naše předběžné zkušenosti ukazují, že provedená vyšetření budou přinášet nejen nová poznání ale bude je možno zřejmě i využít při řízení léčby. Všechny vzorky po provedeném vyšetření budou zničeny. Účast ve studii pro Vás neznamena žádné zatížení, bude použit jen materiál, který se odebírá k běžně prováděným laboratorním vyšetřením. Máte rovněž právo ze studie kdykoliv odstoupit. Věříme, že výsledky studie přispějí ke zlepšení léčby uvedených onemocnění. Anonymizovaná data mohou být publikována v odborné literatuře. Přečetla jsem si informaci o studii a rozumím jí. Souhlasím s účastí v projektu za výše uvedených podmínek.

V Olomouci dne.....

Jméno lékaře, který získal souhlas

.....

Podpis lékaře

Jméno pacientky

.....

Podpis nemocné

PŘÍLOHA Č. 4

Publikace – přehledový článek v recenzovaném časopise

Význam trifolátů u gynekologických onemocnění

The role of trefoil factor family in gynecological disease

Neubert D.¹, Pilka R.¹, Stejskal D.^{2,3}, Krejčí G.³

¹Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP, Olomouc, přednosta prof. MUDr. R. Pilka, Ph.D.

²VIA Agel, ředitelka Mgr. Ing. K. Murtingerová

³Oddělení laboratorní medicíny Středomoravské nemocniční, a.s., přednosta prof. MUDr. D. Stejskal, Ph.D.

ABSTRACT

Aim: Trefoil peptides are a family of small proteins that are expressed in a site-specific fashion by certain epithelial tissues. These peptides appear to be important in mucosal healing processes, in neoplastic disease and in human reproduction.

Design: Literature review.

Setting: Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital, Medical Faculty, Palacký University, Olomouc, Czech Republic; Department of Laboratory Biochemistry, Central Moravian Hospital Trust, Member of Agel holding, Prostějov.

Methods: Literature review.

Results: Trefoil peptides are aberrantly expressed by a wide range of human carcinomas and gastrointestinal inflammatory conditions. Outside the gastrointestinal

tract, members of this group of peptides have also been identified in the normal hypothalamus and pituitary, and in normal breast tissue where it is responsive to oestrogen stimulation. Evidence of peptide expression has been found in a range of urological, gynaecological, gastrointestinal, pulmonary and breast carcinomas. Furthermore, possible associations between recurrent spontaneous abortion susceptibility and genetic variation in the TFF3 gene were shown.

Conclusion In the future, serum levels of trefoil peptides might be used as markers for neoplastic and inflammatory diseases, as well as some defects of reproduction.

KEYWORDS

TFF, carcinoma, endometrial, recurrent miscarriage, trefoil factor, serous

SOUHRN

Cíl: Trifol peptidy patří do skupiny malých peptidů, jejichž exprese je místně i tkáňově specifická. Tyto peptidy mají význam pro hojení sliznic, u nádorových onemocnění a v lidské reprodukci.

Typ studie: Literární přehled.

Název a sídlo pracoviště: Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP Olomouc; Oddělení klinické biochemie, Středomoravská nemocniční a.s., Nemocnice Prostějov.

Výsledky: Trifoláty jsou v různé míře exprimovány v celé řadě karcinomů a u zánětlivých gastrointestinálních onemocnění. Mimo gastrointestinální trakt byly fyziologicky identifikovány v hypotalamu, hypofýze, endo-

metriu a v normální prsní tkáni, kde reagují na stimulaci estrogenu. Expres trifolátů byla zjištěna v nádorech urologických, gynekologických, gastrointestinálních, plicních a v karcinomu prsu. Navíc byly prokázány možné souvislosti mezi genetickými polymorfismy TFF3 a habituálním potrácením.

Závěr: V budoucnu by mohly být sérové hladiny trifolátů využívány jako markery pro nádorová a zánětlivá onemocnění, stejně jako pro poruchy reprodukce.

KLÍČOVÁ SLOVA

TFF, karcinom, endometriální, habituální potrácení, trefoil faktor, sérový

MUDr. David Neubert, e-mail: david.neubert@seznam.cz

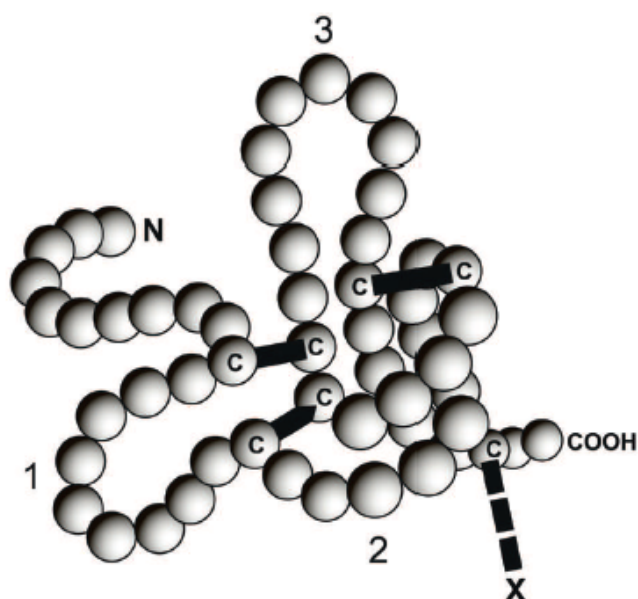
Čes. Gynek., 2016, 81, č. 6, s. 444–450

ÚVOD

Trefoil peptidy (trifoláty) patří do skupiny malých peptidů bohatých na cystein. Trifolátové proteiny jsou definovány přítomností 42–43 aminokyselin, které tvoří unikátní strukturální motiv. Jejich tři páry disulfidových vazeb jsou zodpověd-

né za charakteristický vzhled molekuly ve tvaru trojlístku.

Byly pojmenovány jako „trefoil“ peptidy Thimem v roce 1989 [44]. Dosud byly identifikovány tři savčí trefoil peptidy. TFF1 byl objeven v roce 1982 při pátrání po estrogenu indukované mRNA



Obr. 1 Znárodnění jedné molekuly trifolátového peptidu (TFF). Klíčky odpovídající za název „trifolát“ jsou očíslovány. Esenciální pro tvar struktury jsou rezidua cysteinu (C). Pro některé funkce trifolátu je nezbytná dimerizace na místě „X“. Tak vzniká struktura podobná TFF2, obsahující dvě domény trifolátu.

v buněčných liniích karcinomu prsu a ve stejném roce byl objeven spazmolytický peptid (TFF2) při izolaci prasečího inzulinu [21, 28]. Střevní trifolát TFF3 byl původně objeven v roce 1991 u krys [41]. Ve snaze o standardizaci nomenklatury jsou tyto trefoil faktory dnes souhrnně nazývány rodina trifolátových peptidů (TFF). Všechny tři jsou zastoupeny v lidském těle a jejich geny jsou umístěny společně na chromozomu 21q22.3 [40]. Z animálních pozorování (myš, krysa, ropucha) je zřejmé, že trifolátová doména je evolučně velmi stabilní [19]. Jednotlivé trifolátové peptidy se tkáňově specificky vyskytují v epiteliálních buňkách lidské gastrointestinální ústrojí: TFF1 v epiteliálních povrchových foveolárních buňkách celého žaludku, TFF2 v distální části žaludku a v dolních částech Brunnerových žlázek duodena a TFF3 v průběhu celé délky tenkého i tlustého střeva [13, 14, 36, 39, 45].

Jedná se o velmi stabilní molekuly, rezistentní k účinkům kyselin, proteáz i tepelné degradaci [21, 35].

Jejich fyziologický výskyt byl již dokumentován i v dalších tkáních – hypofýze, hypotalamu, slinných žlázách, v děloze a prsní tkáni [16, 33, 37, 38]. U mladých žen se vzorec exprese mění v závislosti na menstruačním cyklu. Naopak, v mukózních epiteliálních buňkách respiračního a močového ústrojí nebyly dosud identifikovány a je možné, že probíhající výzkumy odhalí další členy této rodiny. Trifoláty by v budoucnu mohly sloužit jako sérové markery nádorových a inflamačních onemocnění, případně poruch reprodukce.

SOUVISLOST S RŮSTOVÝMI FAKTORY

Ačkoliv byl TFF3 objeven díky své podobnosti s lidským TGIF (transforming growth-interacting factor), nebyl dále prokázán žádný vztah mezi TFF3 a TGIF. Rovněž působení obou peptidů na buněčnou migraci je rozdílné. Jedna ze studií s TFF2 prokazuje „growth factor-like effects“ tohoto peptidu ve vztahu ke kolorektálnímu karcinomu (HCT116) a karcinomu prsu (MCF7). Je prokázán shodný protektivní účinek TFF peptidů, růstových faktorů, epidermálního růstového faktoru (EGF) a fibroblastového růstového faktoru na střevní mukózu [8, 16, 34]. Na zvířecím modelu byl dokumentován shodný vliv TFF3 a EGF na zvýšení sekrece prostaglandinů a elektrolytů v epiteliálních buňkách, která vedla k jejich ochraně proti ulceracím způsobeným účinkem indometacinu. EGF se podílí na regulaci exprese genu pro TFF1 a ovlivňuje celou řadu dalších procesů v těle, jako např. sekreci estrogenu, insulin-like growth faktoru 1, fibroblastového růstového faktoru. K účinkům EGF jsou senzitivní pouze geny pro TFF1, geny pro ostatní TFF peptidy jsou k těmto účinkům rezistentní [20].

MECHANISMUS PŮSOBNÍ

Dosud byly identifikovány dvě základní funkce trefoil peptidů v gastrointestinálním traktu – ochrana sliznic a tkáňové hojení. Tyto peptidy jsou považovány za proteiny „okamžité reakce“ na tkáňové poranění, kde ovlivňují časné fáze tkáňového hojení [35]. Kromě toho je možno tyto proteiny detekovat v případě mnoha humánních karcinomů. Trefoil peptidy zlepšují ochranné schopnosti supramukózní bariéry na povrchu sliznic gastrointestinálního traktu interakcí s mucinózními glykoproteiny a vytvořením viskoelastické mukózní gelové vrstvy chrání tyto buňky před působením žaludečních kyselin [23]. Role těchto peptidů je spatřována v indukci změn fyzikálních vlastností mucinu, vedoucí ke zvýšení optické hustoty a viskozity ochranné slizniční vrstvy. Dále se předpokládá jejich vliv na pohárkové buňky, kde ovlivňují sekreci a kvalitu produkovaného mucinu. TFF peptidy jsou též zřejmě vylučovány jako součást mucinu. Provedené studie předpokládají, že TFF peptidy přispívají k ochraně žaludeční sliznice před acidifikací tvorbou silnější ochranné vrstvy mukózního gelu v žaludku [9].

Další práce přisuzují protektivní roli TFF spíše na úrovni působení na receptory. Transport chloridových iontů v gastrointestinálních epiteliálních buňkách je při pokusech *in vitro* indukovan pouze v případě, když bazolaterální povrch buněk je vystaven působení TFF. Navázání TFF3 na membránový protein kolorektálních epiteliálních buněk je spojeno s následnou fosforylací tyrozinu a beta-ka-

Tab. 1 Výskyt TFF peptidů v jednotlivých orgánech**Za fyziologických podmínek**

Peptid	Orgán	
TFF1	žaludek tenké střevo tlusté střevo slinivka břišní žlučník prsní žláza prostata	hlenové buňky buňky vývodů Brunnerových žláz pohárkové buňky poblíž povrchu krypt fokálně v ductus pancreaticus hlenové žlásky rozestě po sliznici epitel lobulárních a duktálních buněk fyziologická tkáň
TFF2	žaludek tenké střevo slinivka břišní žlučník	fundus; hlenové buňky antra žaludku; hlenové buňky při bázi žláz lalůčky Brunnerových žláz a buňky jejich distálních vývodů fokálně v ductus pancreaticus hlenové žlásky rozestě po sliznici
TFF3	tenké střevo tlusté střevo žlučník hypotalamus hypofýza urogenitální trakt žen	lalůčky Brunnerových žláz a buňky jejich vývodů, pohárové buňky povrchové pohárové buňky hlenové žlásky rozestě po sliznici neurony peri- a paraventrikulárních jader oba laloky v epitelu

Za patologických podmínek

Peptid	Orgán	
TFF1	jícen žaludek tenké střevo tlusté střevo žlučník genitální trakt - ženy ostatní	Barrettův jícen metaplazie, hyperplastické polypy, karcinom metaplazie, chronické ulcerace, UACL UACL, hyperplastické polypy, adenomy, adenokarcinomy karcinom žlučových cest karcinomy: endometria, ovaria (mucinózní>serózní), čípku karcinomy: prsu, slinivky břišní, prostaty, močového měchýře, plic
TFF2	jícen tenké střevo tlusté střevo	Barrettův jícen metaplazie, chronické ulcerace, UACL UACL, hyperplastické polypy, adenomy, adenokarcinomy
TFF3	žaludek tenké střevo tlusté střevo	tkáň přilehlá k ulceracím, mataplazie pohárových buněk chronické ulcerace, UACL hyperplastické polypy, adenomy, adenokarcinomy (mucinózní)

PID – pánevní zánětlivé onemocnění, UACL – ulcer-associated cell lineage

teinu. Tyto cytoplazmatické peptidy poté ovlivňují receptorovou odpověď [20]. Kromě ochrany sliznic trávicího ústrojí hrají TFF významnou roli též v procesu hojení již vzniklého poranění. Na mnoha zvířecích modelech, ale i lidských buněčných koloniích bylo prokázáno, že trefoil peptidy indukují buněčnou migraci, a tím umožňují rychlou obnovu mukózy po jejím poranění, což je proces zvaný restituce [23, 35]. Zvýšená koncentrace TFF peptidů byla pozorována v případech zánětlivých onemocnění střev a dále pak v blízkosti peptických ulcerací, zejména v epiteliálních buňkách migrujících přes bázi vředu [8].

Recentní studie podporují hypotézu významu TFF peptidů ve stimulaci obnovy gastrointestinálních poranění. Při pokusech na myších s nadprodukcí TFF2 byla demonstrována zvýšená rezistence na indometacinem indukované poškození sliznic [34]. Myši s nedostatkem genu pro TFF3 vykazovaly poruchu slizničního hojení a podléhaly důsledkům zánětlivých střevních onemocnění [27]. Stimulací migrace epiteliálních buněk z okrajů rány spolu se zplošťováním přiléhajících nepoškozených buněk přispívají tyto peptidy k obnově integrity sliznic [24].

VZTAH K NEOPLAZIÍM

TFF1 byl původně izolován z buněk karcinomu prsu. Od té doby několik studií dokumentovalo vztah mezi TFF peptidy a vznikem neoplazií. Expres TFF1 byla prokázána u mnoha známých epiteliálních karcinomů, včetně karcinomu prsu, žaludku, slinivky, plic, endometria, vaječníku (zejména mucinózní typ), prostaty a dále některých nádorů močového měchýře a hrdla děložního [5, 17]. Rozdílná exprese TFF proteinů u jednotlivých nádorů je nicméně poměrně dobře zdokumentována. U karcinomu prsu, kde je exprese TFF1 přítomna až u 50 % nádorů, je pozitivita na TFF1 spojena se stavem estrogenových receptorů, odpovědí na hormonální léčbu a příznivou prognózou [7, 11]. U všech ostatních tumorů se zdá být přítomnost TFF1 nezávislá na stavu estrogenových receptorů.

Dosud není známo, zda TFF peptidy ovlivňují vznik tumoru či jeho metastázování. Možnost detekovat TFF v nádorových tkáních či stanovit jejich sérovou koncentraci by mohlo být klinicky užitečné.

Karcinom prsu

TFF1 byl objeven v souvislosti s karcinomem prsu [28, 35]. Bylo prokázáno, že většina karcinomů prsu vykazuje přítomnost TFF1 a TFF3 [37]. Ve více než 68 % případů tohoto karcinomu byla zjištěna zvýšená exprese TFF1, TFF3 bylo exprimováno v 90 % případů [30, 37]. Zvýšená exprese TFF1 i TFF3

Tab. 2 Výskyt TFF u nádorových onemocnění

	TFF1	TFF2	TFF3
Gastrointestinální trakt	karcinom žaludku karcinom žlučníku a žlučových cest kolorektální hyperplastické polypy kolorektální karcinom	karcinom žaludku karcinom žlučníku a žlučových cest kolorektální hyperplastické polypy	hepatocelulární karcinom kolorektální hyperplastické polypy kolorektální karcinom
Endokrinní a exokrinní žlázy	karcinom pankreatu karcinom prsu (LCIS, DCIS) karcinom štítné žlázy	karcinom pankreatu	karcinom prsu (LCIS, DCIS)
Urogenitální trakt	karcinom močového měchýře karcinom prostaty karcinom vaječníku karcinom děložního čípku karcinom děložního těla		
Respirační ústrojí	bronchiální karcinom		malobuněčný karcinom plic

LCIS – lobulární karcinom in situ, DCIS – duktální karcinom in situ

byla prokázána jak v případě duktálního a lobulárního karcinomu in situ, tak i v případě karcinomu invazivního [37].

Karcinom prostaty

Většina karcinomů prostaty exprimuje TFF1. Přítomnost TFF1 vykazuje kromě vlastního maligního tumoru též přilehlá tkáň hyperplastická, na druhou stranu fyziologická prostatická tkáň je TFF1 negativní [5]. Toto zjištění se jeví jako klinicky významné při hodnocení histologicky negativních biopsií prostaty, která jsou však TFF1 pozitivní. Tento nálezný může predikovat vysokou pravděpodobnost přítomnosti malignity kdekoli v prostatické tkáni. TFF1 je detekováno ve velmi úzké návaznosti na neuroendokrinní buňky karcinomu prostaty; význam tohoto vztahu však zůstává nejasný [5]. Neuroendokrinní buňky ve střevní tkáni postižené chronickou ulcerací však rovněž exprimují TFF1, což by mohlo znamenat, že trifoláty mohou hrát roli v modulaci buněčného uvolňování neuroendokrinních peptidů.

Karcinom žaludku

TFF1 je běžně přítomen v žaludeční tkáni. Expresie TFF1 je nižší v případě adenomu a karcinomu žaludku v porovnání s hyperplastickými polypy či normální tkání mukózy [25]. Až v polovině případů všech karcinomů žaludku pak expresie genu pro TFF1 zcela chybí [17, 26]. Některé práce prokazují vztah mezi expresí TFF1 a stagingem tumoru. Expresie TFF3 pak byla prokázána v enterocytech adenomů a karcinomů tlustého střeva, kdy tyto enterocyty současně ztrácejí svou typickou morfologii pohárkových (goblet) buněk. Zatímco kompletní ztráta exprese proteinů je u karcino-

mů tlustého střeva vzácná, snížené hladiny jsou často asociovány s nekrózou tumoru a pokročilým stagingem [42].

Kolorektální karcinom

TFF3 je běžně ve velkém množství obsažen ve slizničních buňkách tlustého střeva za fyziologického stavu, zatímco v případě kolorektální neoplazie je jeho množství značně sníženo [42]. U kolorektálních adenomů byla popsána silná pozitivní korelace mezi expresí TFF3 a stupněm dysplastických změn [42]. Ztráta exprese TFF3 naopak koreluje se ztrátou buněčné diferenciaci a s pokročilejším stadiem onemocnění [42, 46]. To může ukazovat na význam TFF pro průběh tumorigeneze a pro přechod z adenomu do metastatického karcinomu, zejména s ohledem na jejich migrační a cytokinetický efekt.

Nádory plic

Benigní tumory plic, skvamózní či malobuněčný bronchogenní karcinom nejsou spojeny se zvýšenou sérovou hladinou TFF1 [18]. Naopak, zvýšené průměrné sérové hladiny a imunohistochemická pozitivita byly prokázány u pokročilých stadií bronchogenního karcinomu, zejména u „goblet cell“ podtypů a karcinomu bronchoalveolárního. TFF1 pozitivní adenokarcinomy plic jsou rovněž spojeny s horší prognózou než karcinomy TFF1 negativní [18].

GYNEKOLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ

Karcinom endometria

V nedávných studiích byly prokázány vyšší sérové hladiny TFF3 u pacientek s endometriálním

karcinomem G3 ve srovnání se zdravými kontrolami a pacientkami s hyperplazií endometria [4]. Podobně imunohistochemické analýzy ukázaly zvýšenou expresi TFF3 u špatně diferencovaných endometriálních karcinomů [32]. Použití imunohistochemického panelu obsahujícího estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR), insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) a TFF3 umožňuje bezpečně odlišit vzácné podtypy karcinomu endometria G3 od serózního karcinomu a karcinomu z jasných buněk. Na rozdíl od špatně diferencovaného karcinomu endometria mají přes podobnou histopatologii serózní karcinom a karcinom z jasných buněk výrazně horší prognózu z hlediska přežití pacientek. Možnost odlišení těchto nádorů pomocí imunomarkerů nabývá na významu zejména v případě, že je tento krok možné učinit již na materiálu získaném z biopsie/kyretáže a následně včas uzpůsobit adekvátní management léčby těchto onemocnění [31].

Receptivita endometria a habituální potrácení

Je známo, že povrchové muciny jsou důležité pro receptivitu endometria a jeho schopnost selekce a implantace vysoce kvalitních embryí. Současně u žen s habituálním potrácením byla prokázána nižší endometriální exprese určitých mucinů ve srovnání s ženami zdravými. Tato snížená exprese může být příčinou narušené receptivity endometria umožňující implantaci defektních embryí [3, 12, 43]. U žen s habituálním potrácením byly rovněž zjištěny nižší hladiny endometriálních mucinů v sekreční fázi cyklu [3]. Produkce TFF3 byla kromě jiných epiteliálních povrchů prokázána i v děložním endometriu [6, 22]. Pomocí genové analýzy byl TFF3 rovněž identifikován jako jeden z možných faktorů receptivity endometria v období implantace [2]. V nedávné studii byla prokázána souvislost mezi genovými polymorfismy TFF3, počtem úspěšně ukončených těhotenství a habituálním potrácením [15].

TFF JAKO BIOMARKERY ONEMOCNĚNÍ

Jaká je možná role TFF jako markerů v nové éře stratifikované medicíny? Nabízí se celkem šest možností využití těchto markerů. Především je nutno upřesnit, které buňky podléhají regulaci těmito proteiny a zda jsou tyto proteiny produkovány nádorovými buňkami. Za normálních okolností jsou TFF secernovány intraluminárně a uplatňují svůj protektivní vliv na epiteliální hlenovou vrstvu. U invazivních nádorů však jsou TFF secernovány do stromatu, a indukují tak metastatický fenotyp.

Druhou otázkou je, zda je nutno odlišovat různé molekulární formy. Z dosavadních studií se zdá,

že ano, protože TFF1 diomer má větší potenci než monomer. Nádory žaludku tak mají větší sklon k metastázování, pokud chybí sekrece heterodimeru TFF1 [29].

Třetí zkoumanou oblastí je, zda TFF1 a TFF3 jsou prediktivními markery odpovědi na endokrinní terapii. Existují v tomto směru velmi silné podpůrné argumenty zejména pro využití TFF1 u karcinomu prsu [10].

Čtvrtým aspektem je vztah trifolátů k metastázám. TFF3 umožňuje odlišit buňky s větším či menším sklonem k metastázování; jeho vyšší exprese je asociována s tendencí k lymfovaskulární invazi. Ke zvážení je zde tak možnost, že stanovování hladin trifolátů jako prognostických biomarkerů by mohlo identifikovat špatně diferencované nádory s horší prognózou, a tak nahradit vyšetřování lymfatických uzlin [1].

Pátou oblastí jejich využití jako biomarkerů je možnost rozlišení pomocí hladin trifolátů případnou vnitřní heterogenitu nádorů. Pro prognostické biomarkery invaze a metastázování (v tomto případě trifolátů) by bylo velmi důležité, pokud by jejich sérové hladiny byly schopny odlišit existenci více, či méně agresivních populací buněk v nádoru. Právě případná možnost stanovení podílu buněk v nádoru se sklonem k metastázování by byla nesmírně důležitá a přínosná.

Poslední, šestou možností je využití trifolátů v diagnostice a léčbě patologických stavů reprodukce ve smyslu habituálního potrácení a poruch receptivity endometria a implantace.

ZÁVĚR

Význam TFF peptidů je postupně studován od okamžiku jejich objevu v roce 1982. Ukazuje se, že spolu s lumenálními muciny hrají ústřední roli v ochraně sliznic žaludku a střev a podílejí se na hojivém procesu po ulceraci. Jejich exprese a biologická aktivita jsou úzce spojeny s hormonálním řízením, růstovými faktory a onkogenními stimuly. Změny v jejich expresi s následnými poruchami sekrece mucinů mohou být příčinou narušené receptivity endometria. Na základě experimentálních a observačních studií je zřejmý jejich potenciální význam v morfogenezi, maligní transformaci a poruchách reprodukce.

LITERATURA

1. Ahmed, AR., Griffiths, AB., Tilby, MT., et al. TFF3 is a normal breast epithelial protein and is associated with differentiated phenotype in early breast cancer but predisposes to invasion and metastasis in advanced disease. *Am J Pathol*, 2012, 180(3), p. 904–916.

2. **Altmae, S., Martinez-Conejero, JA., Salumets, A., et al.** Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(3), p. 178–187.
3. **Aplin, JD., Hey, NA., Li, TC.** MUC1 as a cell surface and secretory component of endometrial epithelium: reduced levels in recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*, 1996, 35(3), p. 261–266.
4. **Bignotti, E., Ravaggi, A., Tassi, RA., et al.** Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *Br J Cancer*, 2008, 99(5), p. 768–773.
5. **Bonkhoff, H., Stein, U., Welter, C., et al.** Differential expression of the pS2 protein in the human prostate and prostate cancer: association with premalignant changes and neuroendocrine differentiation. *Hum Pathol*, 1995, 26(8), p. 824–828.
6. **Borthwick, JM., Charnock-Jones, DS., Tom, BD., et al.** Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2003, 9(1), p. 19–33.
7. **Cappelletti, V., Coradini, D., Scanziani, E., et al.** Prognostic relevance of pS2 status in association with steroid receptor status and proliferative activity in node-negative breast cancer. *Eur J Cancer*, 1992, 28A(8–9), p. 1315–1318.
8. **Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., et al.** Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest*, 1994, 94(1), p. 376–383.
9. **Engel, E., Guth, PH., Nishizaki, Y., et al.** Barrier function of the gastric mucus gel. *Am J Physiol*, 1995, 269(6 Pt 1), p. G994–999.
10. **Foekens, JA., Portengen, H., Look, MP., et al.** Relationship of pS2 with response to tamoxifen therapy in patients with recurrent breast cancer. *Br J Cancer*, 1994, 70(6), p. 1217–1223.
11. **Foekens, JA., Rio, MC., Seguin, P., et al.** Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res*, 1990, 50(13), p. 3832–3837.
12. **Gipson, IK., Blalock, T., Tisdale, A., et al.** MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol Reprod*, 2008, 78(1), p. 134–142.
13. **Hanby, AM., Poulson, R., Elia, G., et al.** The expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in 'gastric metaplasia' of the proximal duodenum: implications for the nature of 'gastric metaplasia'. *J Pathol*, 1993, 169(3), p. 355–360.
14. **Hanby, AM., Poulson, R., Singh, S., et al.** Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology*, 1993, 105(4), p. 1110–1116.
15. **Haroun, S., Altmae, S., Karypidis, H., et al.** Association between trefoil factor 3 gene variants and idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Reprod Biomed Online*, 2014, 29(6), p. 737–744.
16. **Hauser, F., Poulson, R., Chinery, R., et al.** hP1.B, a human P-domain peptide homologous with rat intestinal trefoil factor, is expressed also in the ulcer-associated cell lineage and the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(15), p. 6961–6965.
17. **Henry, JA., Bennett, MK., Piggott, NH., et al.** Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours. *Br J Cancer*, 1991, 64(4), p. 677–682.
18. **Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., et al.** Estimation of serum level of pS2 protein in patients with lung adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 1996, 16(4B), p. 2351–2355.
19. **Hoffmann, W.** A new repetitive protein from *Xenopus laevis* skin highly homologous to pancreatic spasmolytic polypeptide. *J Biol Chem*, 1988, 263(16), p. 7686–7690.
20. **Chinery, R., Cox, HM.** Modulation of epidermal growth factor effects on epithelial ion transport by intestinal trefoil factor. *Br J Pharmacol*, 1995, 115(1), p. 77–80.
21. **Jorgensen, KH., Thim, L., Jacobsen, HE.** Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept*, 1982, 3(3–4), p. 207–219.
22. **Kao, LC., Tulac, S., Lobo, S., et al.** Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 2002, 143(6), p. 2119–2138.
23. **Kindon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., et al.** Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology*, 1995, 109(2), p. 516–523.
24. **Lacy, ER., Morris, GP., Cohen, MM.** Rapid repair of the surface epithelium in human gastric mucosa after acute superficial injury. *J Clin Gastroenterol*, 1993, 17, Suppl. 1, p. S125–S135.
25. **Machado, JC., Cameiro, F., Blin, N., et al.** Pattern of pS2 protein expression in premalignant and malignant lesions of gastric mucosa. *Eur J Cancer Prev*, 1996, 5(3), p. 169–179.
26. **Machado, JC., Carneiro, F., Ribeiro, P., et al.** pS2 protein expression in gastric carcinoma. An immunohistochemical and immunoradiometric study. *Eur J Cancer*, 1996, 32A(9), p. 1585–1590.
27. **Mashimo, H., Wu, DC., Podolsky, DK., et al.** Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*, 1996, 274(5285), p. 262–265.
28. **Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., et al.** Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res*, 1982, 10(24), p. 7895–7903.
29. **May, FE., Griffin, SM., Westley, BR.** The trefoil factor interacting protein TFIZ1 binds the trefoil protein TFF1 preferentially in normal gastric mucosal cells but the co-expression of these proteins is deregulated in gastric cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(3), p. 632–640.
30. **May, FE., Westley, BR.** Cloning of estrogen-regulated messenger RNA sequences from human breast cancer cells. *Cancer Res*, 1986, 46(12 Pt 1), p. 6034–6040.
31. **Mhaweck-Fauceglia, P., Yan, L., Liu, S., et al.** ER+ /PR+ / TFF3+ /IMP3- immunoprofile distinguishes endometrioid from serous and clear cell carcinomas of the endometrium, p. a study of 401 cases. *Histopathology*, 2013, 62(7), p. 976–985.
32. **Mhaweck, P., Benz, A., Cerato, C., et al.** Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. *Mod Pathol*, 2005, 18(3), p. 340–348.
33. **Piggott, NH., Henry, JA., May, FE., et al.** Antipeptide antibodies against the pNR-2 oestrogen-regulated protein of human breast cancer cells and detection of pNR-2 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J Pathol*, 1991, 163(2), p. 95–104.

34. **Playford, R.J., Marchbank, T., Goodlad, R.A., et al.** Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(5), p. 2137–2142.
35. **Playford, R.J., Marchbank, T., Chinery, R., et al.** Human spasmodic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology*, 1995, 108(1), p. 108–116.
36. **Podolsky, D.K., Lynch-Devaney, K., Stow, J.L., et al.** Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem*, 1993, 268(9), p. 6694–6702.
37. **Poulsom, R., Hanby, A.M., Lalani, E.N., et al.** Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmodic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J Pathol*, 1997, 183(1), p. 30–38.
38. **Probst, J.C., Zetzsche, T., Weber, M., et al.** Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide. *FASEB J*, 1996, 10(13), p. 1518–1523.
39. **Rio, M.C., Bellocq, J.P., Daniel, J.Y., et al.** Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science*, 1988, 241(4866), p. 705–708.
40. **Seib, T., Blin, N., Hilgert, K., et al.** The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics*, 1997, 40(1), p. 200–202.
41. **Suemori, S., Lynch-Devaney, K., Podolsky, D.K.** Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(24), p. 11017–1121.
42. **Taupin, D., Ooi, K., Yeomans, N., et al.** Conserved expression of intestinal trefoil factor in the human colonic adenoma-carcinoma sequence. *Lab Invest*, 1996, 75(1), p. 25–32.
43. **Teklenburg, G., Salker, M., Heijnen, C., et al.** The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(12), p. 886–895.
44. **Thim, L.** A new family of growth factor-like peptides. „Trefoil” disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmodic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett*, 1989, 250(1), p. 85–90.
45. **Tomasetto, C., Rio, M.C., Gautier, C., et al.** hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J*, 1990, 9(2), p. 407–414.
46. **Uchino, H., Kataoka, H., Itoh, H., et al.** Expression of intestinal trefoil factor mRNA is downregulated during progression of colorectal carcinomas. *J Clin Pathol*, 1997, 50(11), p. 932–934.

MUDr. David Neubert
 Porodnicko-gynekologická klinika
 FN a LF UP
 I. P. Pavlova 6
 775 00 Olomouc
 e-mail: david.neubert@seznam.cz

PŘÍLOHA Č. 5

Publikace – původní vědecká publikace v časopise s IF

ANTICANCER RESEARCH

International Journal of Cancer Research and Treatment

ISSN: 0250-7005

Systemic Inflammatory Response After Open, Laparoscopic and Robotic Surgery in Endometrial Cancer Patients

RADOVAN PILKA¹, RADIM MAREK¹, TOMAS ADAM³, MILAN KUDELA¹,
DANA ONDROVÁ¹, DAVID NEUBERT¹, JOZEF HAMBÁLEK¹, MARTIN MADĚRKA¹,
DAGMAR SOLICHOVÁ⁴, LENKA KUJOVSKÁ KRČMOVÁ⁴ and BOHUSLAV MELICHAR²

¹*Department of Obstetrics and Gynecology,
Medical Faculty Palacký University and Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic;*

²*Department of Oncology, Medical Faculty Palacký University and Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic;*

³*Department of Laboratory Biochemistry, Medical Faculty Palacký University and Faculty Hospital,
Olomouc, Czech Republic;*

⁴*Third Department of Medicine-Gerontology and Metabolic Care,
University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic*

Reprinted from
ANTICANCER RESEARCH 36: 2909-2922 (2016)

ANTICANCER RESEARCH

International Journal of Cancer Research and Treatment



ISSN (print): 0250-7005
ISSN (online): 1791-7530

Editorial Board

P. A. ABRAHAMSSON, Malmö, Sweden
B. B. AGGARWAL, Houston, TX, USA
T. AKIMOTO, Kashiwa, Chiba, Japan
P. Z. ANASTASIADIS, Jacksonville, FL, USA
A. ARGIRIS, San Antonio, TX, USA
J. P. ARMAND, Toulouse, France
V. I. AVRAMIS, Los Angeles, CA, USA
R. C. BAST, Houston, TX, USA
D.-T. BAU, Taichung, Taiwan, ROC
G. BAUER, Freiburg, Germany
E. E. BAULIEU, Le Kremlin-Bicêtre, France
E. J. BENZ, Jr., Boston, MA, USA
J. BERGH, Stockholm, Sweden
F. T. BOSMAN, Lausanne, Switzerland
G. BROICH, Monza, Italy
Ø. S. BRULAND, Oslo, Norway
J. M. BUATTI, Iowa City, IA, USA
M. M. BURGER, Basel, Switzerland
M. CARBONE, Honolulu, HI, USA
C. CARLBERG, Kuopio, Finland
J. CARLSSON, Uppsala, Sweden
A. F. CHAMBERS, London, ON, Canada
P. CHANDRA, Frankfurt am Main, Germany
L. CHENG, Indianapolis, IN, USA
J.-G. CHUNG, Taichung, Taiwan, ROC
E. DE CLERCQ, Leuven, Belgium
W. DEN OTTER, Amsterdam, The Netherlands
E. P. DIAMANDIS, Toronto, ON, Canada
G. TH. DIAMANDOPOULOS, Boston, MA, USA
D. W. FELSHER, Stanford, CA, USA
J. A. FERNANDEZ-POL, Chesterfield, MO, USA
I. J. FIDLER, Houston, TX, USA
A. P. FIELDS, Jacksonville, FL, USA
B. FUCHS, Zurich, Switzerland
D. FUCHS, Innsbruck, Austria
G. GABBIANI, Geneva, Switzerland
R. GANAPATHI, Charlotte, NC, USA
A. F. GAZDAR, Dallas, TX, USA
J. H. GESCHWIND, Baltimore, MD, USA
A. GIORDANO, Philadelphia, PA, USA
G. GITSCH, Freiburg, Germany
R. H. GOLDFARB, Guilford, CT, USA
L. HELSON, Quakertown, PA, USA
R. M. HOFFMAN, San Diego, CA, USA
S. C. JHANWAR, New York, NY, USA
J. V. JOHANNESSEN, Oslo, Norway
B. KAINA, Mainz, Germany
P. -L. KELLOKUMPU-LEHTINEN, Tampere, Finland
D. G. KIEBACK, Schleswig, Germany
R. KLAPDOR, Hamburg, Germany
S. D. KOTTARIDIS, Athens, Greece
G. R. F. KRUEGER, Köln, Germany
Pat M. KUMAR, Manchester, UK

Shant KUMAR, Manchester, UK
O. D. LAERUM, Bergen, Norway
F. J. LEJEUNE, Lausanne, Switzerland
L. F. LIU, Piscataway, NJ, USA
D. M. LOPEZ, Miami, FL, USA
E. LUNDGREN, Umeå, Sweden
Y. MAEHARA, Fukuoka, Japan
J. MAHER, London, UK
J. MARESCAUX, Strasbourg, France
J. MARK, Skövde, Sweden
S. S. MARTIN, Baltimore, MD, USA
S. MITRA, Houston, TX, USA
S. MIYAMOTO, Fukuoka, Japan
M. MUELLER, Villingen-Schwenningen, Germany
F. M. MUGGIA, New York, NY, USA
M. NAMIKI, Kanazawa, Ishikawa, Japan
R. NARAYANAN, Boca Raton, FL, USA
K. NILSSON, Uppsala, Sweden
S. PATHAK, Houston, TX, USA
J.L. PERSSON, Malmö, Sweden
G. J. PILKINGTON, Portsmouth, UK
C. D. PLATSOUKAS, Norfolk, VA, USA
A. POLLIACK, Jerusalem, Israel
M. RIGAUD, Limoges, France
U. RINGBORG, Stockholm, Sweden
M. ROSELLI, Rome, Italy
A. SCHAUER, Göttingen, Germany
M. SCHNEIDER, Wuppertal, Germany
A. SETH, Toronto, ON, Canada
G. V. SHERBET, Newcastle-upon-Tyne, UK
G.-I. SOMA, Kagawa, Japan
G. S. STEIN, Burlington, VT, USA
T. STIGBRAND, Umeå, Sweden
T. M. THEOPHANIDES, Athens, Greece
P. M. UELAND, Bergen, Norway
H. VAN VLIERBERGHE, Ghent, Belgium
R. G. VILE, Rochester, MN, USA
M. WELLER, Zurich, Switzerland
B. WESTERMARK, Uppsala, Sweden
Y. YEN, Duarte, CA, USA
M.R.I. YOUNG, Charleston, SC, USA
B. ZUMOFF, New York, NY, USA

J. G. DELINASIOS, Athens, Greece
Managing Editor

G. J. DELINASIOS, Athens, Greece
Assistant Managing Editor and
Executive Publisher

E. ILIADIS, Athens, Greece
Production Editor

Editorial Office: International Institute of Anticancer Research, 1st km Kapandritiou-Kalamou Rd., Kapandriti, P.O. Box 22, Attiki 19014, Greece. Tel / Fax: +30-22950-53389.

U.S. Branch: Anticancer Research USA, Inc., 111 Bay Avenue, Highlands, NJ 07732, USA.

E-mails: Editorial Office: journals@iia-anticancer.org

Managing Editor: editor@iia-anticancer.org

ANTICANCER RESEARCH supports: (a) the establishment and the activities of the INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH (IAR; Kapandriti, Attiki, Greece); and (b) the organization of the International Conferences of Anticancer Research. The IAR is a member of UICC. For more information about ANTICANCER RESEARCH, IAR and the Conferences, please visit the IAR website: www.iia-anticancer.org

Publication Data: ANTICANCER RESEARCH (AR) is published monthly from January 2009. Each annual volume comprises 12 issues. Annual Author and Subject Indices are included in the last issue of each volume. ANTICANCER RESEARCH Vol. 24 (2004) and onwards appears online with Stanford University HighWire Press from April 2009.

Copyright: On publication of a manuscript in AR, which is a copyrighted publication, the legal ownership of all published parts of the paper passes from the Author(s) to the Journal.

Annual Subscription Rates 2016 per volume: Institutional subscription US\$ 1,898.00 (online) or US\$ 2,277.00 (print & online). Personal subscription US\$ 897.00 (online) or US\$ 1,277.00 (print & online). Prices include rapid delivery and insurance. The complete previous volumes of Anticancer Research (Vol. 1-35, 1981-2015) are available at 50% discount on the above rates.

Subscription Orders: Orders can be placed at agencies, bookstores, or directly with the Publisher. (e-mail: subscriptions@iia-anticancer.org)

Advertising: All correspondence and rate requests should be addressed to the Editorial Office.

Book Reviews: Recently published books and journals should be sent to the Editorial Office. Reviews will be published within 2-4 months.

Articles in ANTICANCER RESEARCH are regularly indexed in all bibliographic services, including Current Contents (Life Sciences), Science Citation Index, Index Medicus, Biological Abstracts, PubMed, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, University of Sheffield Biomedical Information Service, Current Clinical Cancer, AIDS Abstracts, Elsevier Bibliographic Database, EMBASE, Compendex, GEOBASE, EMBiology, Elsevier BIOBASE, FLUIDEX, World Textiles, Scopus, Progress in Palliative Care, Cambridge Scientific Abstracts, Cancergram (International Cancer Research Data Bank), MEDLINE, Reference Update - RIS Inc., PASCAL-CNRS, Inpharma-Reactions (Datastar, BRS), CABS, Immunology Abstracts, Telegen Abstracts, Genetics Abstracts, Nutrition Research Newsletter, Dairy Science Abstracts, Current Titles in Dentistry, Inpharma Weekly, BioBase, MedBase, CAB Abstracts/Global Health Databases, Investigational Drugs Database, VINITI Abstracts Journal, Leeds Medical Information, PubsHub, Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) Data Bases.

Authorization to photocopy items for internal or personal use, or the internal or personal clients, is granted by ANTICANCER RESEARCH, provided that the base fee of \$2.00 per copy, plus 0.40 per page is paid directly to the Copyright Clearance Center, 27 Congress Street, Salem, MA 01970, USA. For those organizations that have been granted a photocopy license by CCC, a separate system of payment has been arranged. The fee code for users of the Transactional Reporting Service is 0250-7005/2016 \$2.00 +0.40.

The Editors and Publishers of ANTICANCER RESEARCH accept no responsibility for the opinions expressed by the contributors or for the content of advertisements appearing therein.

Copyright© 2016, International Institute of Anticancer Research (Dr. John G. Delinasios), All rights reserved.

D.T.P. BY IAR

PRINTED BY ENTYP0, ATHENS, GREECE. PRINTED ON ACID-FREE PAPER

Systemic Inflammatory Response After Open, Laparoscopic and Robotic Surgery in Endometrial Cancer Patients

RADOVAN PILKA¹, RADIM MAREK¹, TOMAS ADAM³, MILAN KUDELA¹,
DANA ONDROVÁ¹, DAVID NEUBERT¹, JOZEF HAMBÁLEK¹, MARTIN MADĚRKA¹,
DAGMAR SOLICHOVÁ⁴, LENKA KUJOVSKÁ KRČMOVÁ⁴ and BOHUSLAV MELICHAR²

¹Department of Obstetrics and Gynecology,

Medical Faculty Palacký University and Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic;

²Department of Oncology, Medical Faculty Palacký University and Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic;

³Department of Laboratory Biochemistry, Medical Faculty Palacký University and Faculty Hospital,
Olomouc, Czech Republic;

⁴Third Department of Medicine-Gerontology and Metabolic Care,
University Hospital, Hradec Králové, Czech Republic

Abstract. *Aim: To study inflammatory response and nutritional biomarkers in operated endometrial cancer (EC) patients. Materials and Methods: A total 109 consecutive EC patients undergoing open laparotomy (LT), laparoscopic (LS) or robot-assisted surgery (RS) were studied. Twenty four patients served as controls. Pre- and postoperative levels of inflammatory and nutritional biomarkers were analyzed prospectively. Results: The estimated blood loss was significantly lower in RS compared to all other groups. C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) correlated with each other and exhibited positive correlation with age, body-mass index (BMI), leukocyte count, platelet count, kynurenine, kynurenine/tryptophan ratio and urinary neopterin and a negative correlation with vitamin D and retinol. Hemoglobin, retinol, alpha-tocopherol, vitamin D and citrulline concentrations decreased and inflammatory biomarkers increased after surgery to a different extent in LT, LS, RS and control groups. Conclusion: The present data demonstrate a differential response to surgical trauma in patients with endometrial carcinoma.*

Endometrial cancer (EC) is the most common cancer of the female genital system (1). Historically, the principal

This article is freely accessible online.

Correspondence to: Professor Radovan Pilka, MD, PhD, Department of Obstetrics and Gynecology, Medical Faculty Palacký University and Faculty Hospital, Olomouc, I.P.Pavlova 6, Olomouc, 779 00, Czech Republic. Tel: +420 585854103, Fax: +420 585414975, e-mail: radovan.pilka@fnol.cz

Key Words: Endometrial cancer, robotic surgery, inflammatory response, nutrition, surgical trauma.

treatment modality of endometrial cancer is surgery that includes abdominal total hysterectomy, salpingo-oophorectomy and pelvic and/or paraortic lymphadenectomy. In 1993, Childers *et al.* were the first to propose the laparoscopic approach in performing complex surgical procedures, such as total hysterectomy (2). The Gynecologic Oncologic group study confirmed the superiority of laparoscopy compared to laparotomy in a randomized study (LAP-2), in terms of complications and hospital stay (3). Subsequently, laparoscopy became the preferred surgical approach in the endometrial cancer staging. Recently, the robotic system Da Vinci (Intuitive Surgical, Sunnyvale, CA, USA) has been introduced. Since the approval of robotic surgery in 2005, the use of robotic surgery has grown exponentially. It has a shorter learning curve compared to conventional laparoscopy and an experience in laparoscopy is not a prerequisite (4, 5).

Surgical intervention elicits an inflammatory response that is accompanied by oxidative stress. There are obvious differences between different therapeutic approaches in terms of tissue trauma and oxidative stress. Different biomarkers of inflammatory response include C-reactive protein (CRP), kynurenine/tryptophan ratio or neopterin. Systemic inflammatory response is also associated with decreased hemoglobin concentrations and higher platelet counts, as well as oxidative stress. Oxidative stress results in decreased concentrations of circulating antioxidants like alpha-tocopherol. The concentrations of alpha-tocopherol, along with other lipid-soluble vitamins like retinol or vitamin D, also reflect the nutritional status of patients. More recently, it was demonstrated that the concentrations of citrulline, a biomarker of bowel mass, also inversely correlates with inflammatory response.

The aim of this study was to compare an association between clinical indicators of surgical trauma with biomarkers of inflammatory response and nutritional balance in endometrial cancer patients treated with three surgical approaches including open laparotomy (LT), laparoscopic (LS) and robotic surgery (RS), as well as in patients operated for benign disorders.

Materials and Methods

Patients. This prospective study was undertaken at the University Hospital Olomouc between October 2012 and June 2015. The study was approved by the hospital's ethical committee and informed, written consent was obtained from all patients. The study group included 109 consecutive patients with histologically confirmed endometrial cancer, aged 65 ± 10 (range=33-88) years who underwent hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy, pelvic and para-aortic lymphadenectomy. These procedures were performed by LT, RS or LS approaches. Twenty four patients, aged 55 ± 12 (range=36-80) years, who were scheduled for elective total hysterectomy for non-malignant disease, constituted a control group. The patients were randomly allocated to receive either an abdominal hysterectomy or laparoscopic assisted hysterectomy for their benign disease. Venous blood samples were collected from each patient at the following times: a baseline sample the day before surgery (day -1), before skin incision (day 0), 24 h after operation (day 1), second, third, fourth and fifth day after surgery (day 2-5). The samples were separated and the sera were all stored at -80°C until analysis for CRP, interleukin-6 (IL-6), citrulline, vitamin D, alpha-tocopherol, retinol, kynurenine and tryptophan. Urinary samples, with the same timing, were collected and stored at -20°C until analysis for urinary neopterin determination. The changes during the postoperative period were assessed by calculation of the area under curve (AUC). Other parameters evaluated were: patient age, body mass index (BMI), blood loss, decline of hemoglobin, increase of white blood cell count, increase of platelet count, number of lymph nodes obtained and visual analogue scale (VAS) scores. BMI was calculated using the formula: $\text{body weight}/\text{height}^2$. Preoperative and postoperative hemoglobin, white blood cells and platelets levels were analyzed on the same days (day-1 to day 5) as the venous blood samples were collected. The difference was calculated by subtracting postoperative levels from the preoperative levels. Postoperative pain was evaluated at the time of admission, before surgery and during the postoperative period (day-1 till day-5) using a 10-point VAS score (0, absence of pain; 10, worst possible pain).

Neopterin, kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum. The blood samples were centrifuged ($1,600 \times g$, 10 min, $+4^\circ\text{C}$) and serum was separated. Then, 200 μl of serum was diluted with 100 μl phosphate buffer (15 mmol/l, pH 6.5) and deproteinized by 100 μl cooled ethanol (10 min, -25°C). After centrifugation ($14,000 \times g$, 10 min), the supernatant was filtered using 0.2- μm micro-titration plate filters and vacuum manifold. Filtered solution was applied into the HPLC column. The analyses were performed using a high performance liquid chromatography (HPLC) set Prominence LC 20 Shimadzu (Kyoto, Japan) composed by degasser DGU 20A5, pump LC20-AB, special auto sampler SIL/20 AC for micro-titration plates (rack changer), column oven CTO-20 AC, diode array detector SPD-M20A, fluorescence detector RF10 AXL and communication bus module CBM-20A. Sample preparation technique was developed

using micro-titration plates with filters AcroPrep 96 filter Plate 0.2 $\mu\text{m}/350 \mu\text{l}$ Pall Corporation (Ann Arbor, MI, USA), vacuum manifold Phenomenex (Aschaffenburg, Germany), vacuum pump VAC Space-50 Chromservis (Prague, Czech Republic) and centrifuge Minispin Eppendorf (Hamburg, Germany). Analysis was performed at HPLC set Prominence LC 20 (Shimadzu) equipped by special auto sampler for micro-titration plates. As stationary phase, two monolithic columns RP-18e (4.6 \times 50 mm, 3.0 \times 100 mm) were connected together with monolithic security guard (4.6 \times 10 mm). As mobile phase, 15 mmol/l phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) was used at pH 4.51 and flow rate 1 ml/min (0-3.09) and 2.3 ml/min (3.10-8.20). Injection volume was 1 μl . Kynurenine and creatinine were detected using diode array detection (230 and 235 nm), neopterin and tryptophan were detected using fluorescent detection (excitation and emission wavelengths of 353 nm and 458 nm for neopterin, respectively, and excitation and emission wavelengths of 254 nm and 404 nm for tryptophan, respectively). Separation was held at ambient temperature in 8.2 min.

Retinol and alpha-tocopherol in human serum. The method used in this study for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in the serum was modified from the method previously published by Urbanek *et al.* and is briefly described below (6). In the liquid-liquid extraction (LLE) procedure, 500 μl of serum was deproteinized using cold ethanol with 5% of methanol. Then, 2,500 μl n-hexane was added to this mixture and extracted using a vortex apparatus. After centrifugation, an aliquot of the clean extract was separated and evaporated in a concentrator. The residue was dissolved in 400 μl of methanol and analyzed using a Prominence HPLC system (Shimadzu) (7). The separation of retinol and alpha-tocopherol was performed using the Chromolith Performance RP-18e monolithic column (100 \times 4.6 mm; Merck, Darmstadt, Germany). The detection of retinol and alpha-tocopherol was carried out at 325 and 295 nm, respectively, using a diode array detector.

Vitamin D in human serum. A total of 50 μl of 4 % monohydrate zinc sulfate as the precipitation reagent and 400 μl of methanol were added to 200 μl of human serum in an Eppendorf tube. After 20 s of vortexing, the sample was incubated for 10 min at 4°C . The sample was then centrifuged ($14,000 \times g$, 5 min, 21°C) and 300 μl of supernatant was filtered using 0.2- μm well filter plates and a vacuum manifold. The filtered solution was injected into the UHPLC system. Analysis was performed by using an UHPLC Nexera set (Shimadzu) coupled with an LCMS-8030 triple-quadrupole mass spectrometer operating in positive ESI mode. Chromatographic separation was achieved on a Kinetex C18 analytical column (1.7 μm , 3 \times 100 mm) connected to a security guard ultra cartridge C18, both purchased from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany). The column oven, CTO-20 AC, was used to set the temperature of the analytical column at 50°C . Acetonitrile and water, both with the addition of FA ($c=0.01 \text{ mol/l}$) were used as the mobile phase at a flow rate of 0.5 ml/min. The separation of metabolites 25-OHD₂ and 25-OHD₃ was realized in 6 min and under isocratic conditions, 72:28 v/v of acetonitrile/ water. After analyte separation, the switching valve was activated and the pre-column and the analytical column were washed and equilibrated for 3min into the waste by increasing the flow rate to 0.8 ml/min with 90:10 v/v of acetonitrile/water. The sample injection volume was 20 μl . The total analysis time was 9 min. System operation, data acquisition and data processing were controlled using the LabSolutions 5.41 SP1 software. MS conditions were investigated using automated

Table I. Comparison of baseline parameters between groups.

Parameter	Mean±SD (range)				p-Value	p-Value (post hoc tests)					
	Robotic surgery (RS)	Laparoscopy (LS)	Laparotomy (LT)	Controls (C)		RS vs. C	LS vs. C	LT vs. C	RS vs. LS	RS vs. LT	LS vs. LT
Age (years)	65±10 (33-81)	59±9 (45-75)	67±10 (52-88)	55±12 (36-80)	<0.0001 ^a	0.0004	0.965	0.0001	0.483	1.000	0.141
BMI (kg/m ²)	31.2±6.8 (15-48.9)	29.0±5.6 (19-38)	34.1±6.7 (24-53.4)	26.8±4.2 (21.4-36.5)	0.0003 ^b	0.017	1.000	0.0001	1.000	0.597	0.144
Hemoglobin (g/l)	133.7±13.5 (95-163)	139.0±8.8 (124-157)	128±12.2 (105-147)	134.0±11.5 (107-150)	0.113 ^b						
Leukocytes (10 ⁹ /l)	7.4±1.9 (3.3-12.6)	7.3±1.3 (5.4-9.2)	8.4±2.4 (4.1-14.9)	7.4±1.9 (4.8-12.1)	0.243 ^b						
Platelets (10 ⁹ /l)	243±69 (52-515)	246±49 (175-369)	274±75 (96-459)	260±61 (144-428)	0.111 ^b						
CRP (mg/l)	4.7±5.9 (0.6-29.2)	1.4±0.9 (0.6-3.4)	12.2±18.0 (0.6-90.0)	2.5±2.9 (0.6-12.3)	0.0001 ^b	0.367	1.000	0.003	0.052	0.036	0.001
IL-6 (ng/l)	4.8±3.3 (1.5-16.2)	2.8±1.3 (1.5-5.9)	8.5±5.5 (2.0-25.4)	2.7±1.3 (1.5-5.8)	<0.0001 ^b	0.003	1.000	<0.0001	0.032	0.002	0.0003
Citrulline (µmol/l)	29.2±8.4 (13-49)	29.3±6.9 (19-43)	31.3±9.9 (12-57)	23.6±7.4 (8-39)	0.011 ^b	0.023	0.168	0.014	1.000	1.000	1.000
Vitamin D (nmol/l)	53.0±25.7 (12-140.8)	69.2±27.1 (25.2-134.8)	45.1±16.4 (15.3-86.2)	0.008 ^b (27-137.4)	0.358	1.000	0.078	0.178	1.000	0.008	
Alpha-tocopherol (µmol/l)	25.1±5.5 (12.9-40.9)	25.1±5.1 (17.0-33.3)	25.4±5.9 (18.6-43.1)	24.3±5.6 (7.5-33.1)	0.986 ^b						
Retinol (µmol/l)	1.1±0.4 (0.3-2.0)	1.5±0.4 (0.7-2.3)	1.2±0.4 (0.5-1.9)	1.0±0.4 (0.3±1.8)	0.005 ^b	1.000	0.002	0.588	0.006	1.000	0.408
Kynurenine (µmol/l)	2.4±1.3 (0.4-8.6)	2.1±0.4 (1.2-3.1)	2.5±0.7 (1.0-4.4)	1.6±0.4 (0.7-2.8)	<0.0001 ^b	0.003	0.003	<0.0001	1.000	0.746	0.625
Tryptophan (µmol/l)	47.7±11.5 (10.8-72.8)	47.1±8.1 (34.1-59.6)	49.5±15.5 (11.2-83)	43.9±9.9 (20.1-63.4)	0.311 ^b						
Kynurenine/tryptophan ratio (mmol/mol)	53.7±40.1 (15.2-284)	44.6±8.7 (26.4-61.4)	56.4±27.9 (25-163.7)	36.6±9.3 (18.5-54.4)	0.004 ^b	0.046	0.072	0.004	1.000	1.000	0.523
Urinary neopterin /creatinine ratio (µmol/mol creatinine)	167±86 (77-502)	151±78 (88-350)	224±179 (85-930)	371±655 (69-2931)	0.325 ^b						

^aANOVA. ^bKruskal-Wallis test. NA, Not applicable; SD, standard deviation; BMI, Body mass index.

optimization of software LabSolution as the first step of the analytical method development. Voltages of Q1, Q3, collision cell and five of the most intensive multiple reaction monitoring (MRM) transitions for identification and quantification of 25-OHD₃ and 25-OHD₂ were found. Other optimized conditions of ion source were as following: interface ESI-positive polarity; interface temperature 350°C; desolvation line (DL) temperature 250°C; nebulising gas flow 3ml/min; heat block temperature 400°C and drying gas flow 15 l/min.

Citrulline in human serum. For citrulline analysis, 20 µl of serum samples were mixed with 100 µl of methanol solution containing 0.1% FA and deuterated internal standards (amino acids and acylcarnitines, non-derivatised reagent kit; Chromsystems, Munich, Germany). The final solutions were vortexed and centrifuged (24,400 × g, 10 min at 24°C, 400 × g at 4°C) and 80 µl of supernatant was transferred to a 96-well plate and used for direct injection mass spectrometry analysis. The remaining supernatant was pooled and used for quality control

purposes (8). The samples were measured on 4000 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) by flow injection mass spectrometry direct analysis infusion with settings as follows: polarity was set to positive mode with IonSpray voltage of 5500 V, capillary temperature of 450°C, Curtain Gas gas of - 20 arbpsi, Ion ion Source source Gas gas (GS1/GS2) of - 40 arbpsi. Methanol containing 0.1 % FA was chosen as a mobile phase. Flow rate was set at 0.03 ml/min (0.1-0.4 min) and 0.30 ml/min (0.0-0.1 and 0.4-0.5 min). Citrulline was measured in MRM mode under optimized parameters of declustering potential and collision energy for each mass transition. Unit resolution was set for isolation ions in mass analyzer. Data were processed by software Chemview 2.0 (AB Sciex).

CRP levels in human serum. Cobas 8000 immunoturbidimetry analyzer (Hitachi, Japan) was used.

IL-6 levels in human serum. Detection was performed by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) using a Cobas 8000 analyzer.

Table II. Comparison of surgical parameters between groups of patients.

Parameter	Mean±SD (range)				p-Value	p-Value (post-hoc tests)					
	Robotic surgery (RS)	Laparoscopy (LS)	Laparotomy (LT)	Controls (C)		RS vs. C	LS vs. C	LT vs. C	RS vs. LS	RS vs. LT	LS vs. LT
Sampled lymph nodes (n)	27±12 (11-64)	21±7 (0-30)	17±14 (0-48)	NA	0.001 ^b	NA	NA	NA	0.423	0.001	0.506
Blood loss (ml)	127±136 (5-650)	206±106 (30-450)	341±197 (50-1000)	198±112 (5-400)	<0.0001 ^b	0.040	1.000	0.007	0.042	<0.0001	0.038
Nadir hemoglobin concentration (g/l)	108±12 (80-136)	107±15 (76-129)	102±10 (79-123)	111±14 (79-123)	0.022 ^b	1.000	1.000	0.051	1.000	0.043	0.906
Decrease of hemoglobin concentration (g/l)	25±11 (0-61)	32±14 (14-69)	27±12 (5-48)	23±10 (7-55)	0.072 ^b						
Pain (VAS)	2±1.9 (0.8-3.4)	1.9±0.6 (1-3)	2.3±0.7 (1-3.8)	1.9±0.5 (0.8-3.8)	0.110 ^b						

^bKruskal-Wallis test. NA, Not applicable; VAS, visual analog scale.

Urinary neopterin concentrations. Urine sample were collected and stored at -20°C until analysis. After centrifugation (5 min, 1,300 × g) and diluting 100 µl of urine specimens with 1.0 ml of mobile phase containing 2 g of disodium- EDTA per liter, samples were injected onto a column and neopterin was determined using HPLC, Prominence LC20 (Shimadzu). Neopterin was identified by its native fluorescence (353 nm excitation, 438 nm emission) and quantified by external standard method. Creatinine was determined by the Jaffe reaction after 1:50 dilution of the sample on a Modular analyzer (Roche) using a commercial kit according to the manufacturer’s instructions. Neopterin concentrations were expressed as neopterin/creatinine ratio (µmol/mol creatinine).

Results

The distribution of investigated parameters in patients with benign tumors (controls), and cancer patients treated with RS, LS and LT at baseline is shown in Table I. The patients in the control group were significantly younger compared to RS and LT groups. BMI was significantly higher in RS and LT groups compared to controls. Baseline CRP was significantly higher in the LT compared to RS, LS and control patients, while IL-6 was significantly higher in the LT compared to RS, LS and control patients and also significantly higher in the RS compared to LS and control patients. Citrulline was significantly higher in RS and LT groups compared to controls. Vitamin D concentrations were significantly lower in the laparotomy compared to the laparoscopy groups, while retinol concentrations were significantly lower in controls and robotic surgery compared to laparoscopy group. Kynurenine concentrations were significantly higher in all groups of EC patients compared to controls, whereas the tryptophan/kynurenine ratio was higher in laparotomy and robotic surgery groups compared to controls (Table I).

Table II shows the comparison of surgical parameters, including blood loss. As significantly higher number of lymph

nodes was sampled during RS compared to LT. The estimated blood loss was significantly lower in RS compared to all other groups, as well as in patients treated with the LS approach and controls compared to LT. The nadir hemoglobin concentration was significantly higher in RS compared to LT patients (Table II).

The concentrations of the biomarkers investigated did not change between day -1 and day 0 indicating that the values were stable. Starting from day 1, however, marked changes were observed. Figure 1A shows the changes of hemoglobin concentrations in the perioperative period in the four groups of patients. Compared to baseline, hemoglobin concentration was decreased on all postoperative days in all four groups of patients (Figure 1A). Figure 1B shows peripheral blood leukocyte counts during the perioperative period. A significant increase in leukocyte counts was evident on day 1 in all four groups and on day 2 in RS and control groups (Figure 1B). Subsequently, the difference of sequential hemoglobin concentrations compared to baseline was not significant. Figure 1C shows platelet counts during the postoperative period. Compared to baseline, CRP and IL-6 concentrations were also significantly increased throughout the postoperative period in all four groups (Figures 1D and 1E). Citrulline concentrations were decreased compared to baseline throughout the postoperative course in the RS and LT groups, as well as on days 1 to 4 in the LS group, with nadir concentrations observed between days 1 and 3. In contrast, in the control group, a significant decrease of citrulline concentrations was evident only on day 1 (Figure 1F). Vitamin D, alpha-tocopherol and retinol concentrations decreased significantly in all four groups with nadir observed between the days 1 and 4 (Figures 1G, H and I). Compared to baseline, kynurenine concentrations decreased in RS group on days 1 and 2 and in the LT group on day 0 (Figure 1J). Tryptophan concentrations were decreased throughout the postoperative

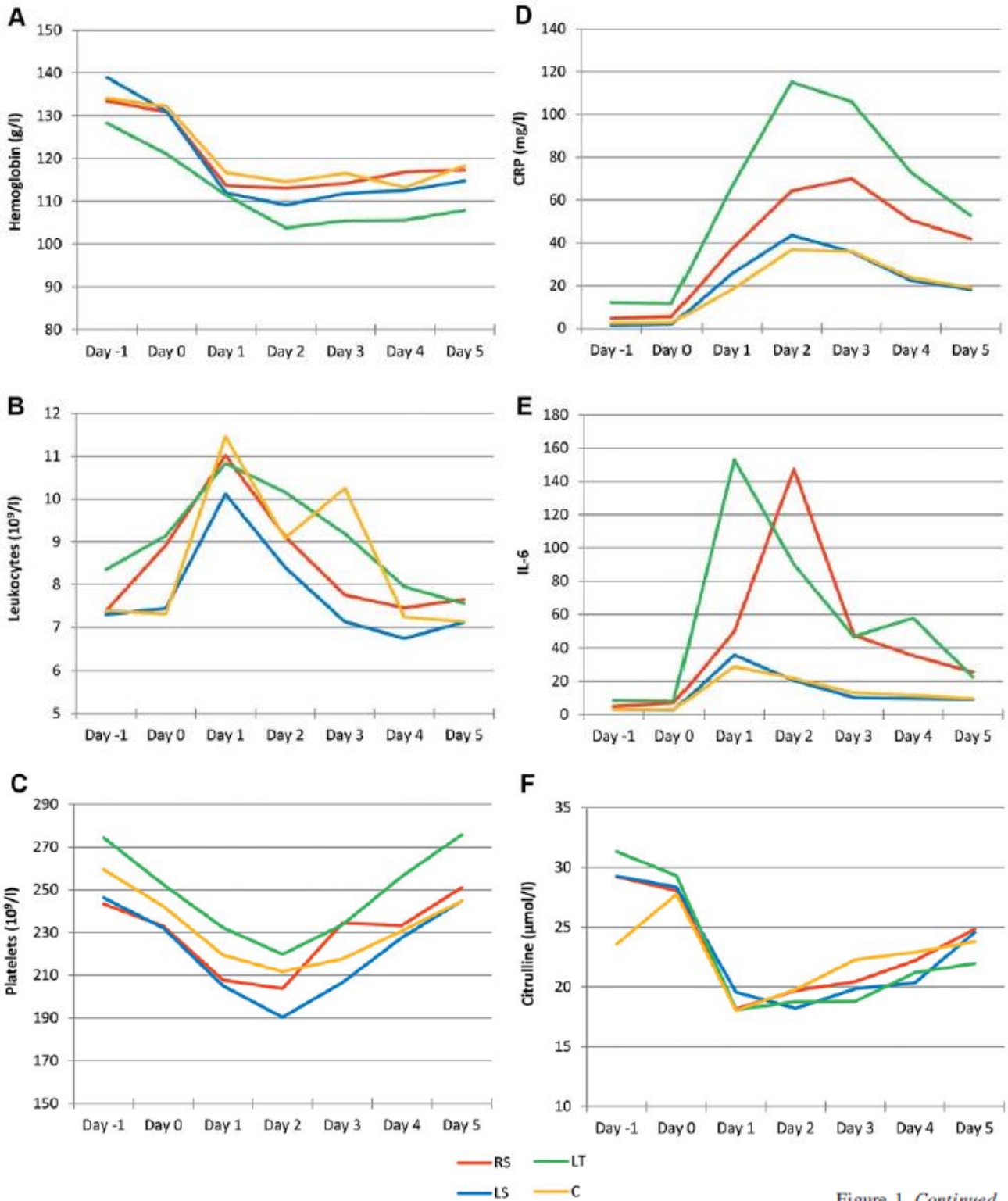


Figure 1. Continued

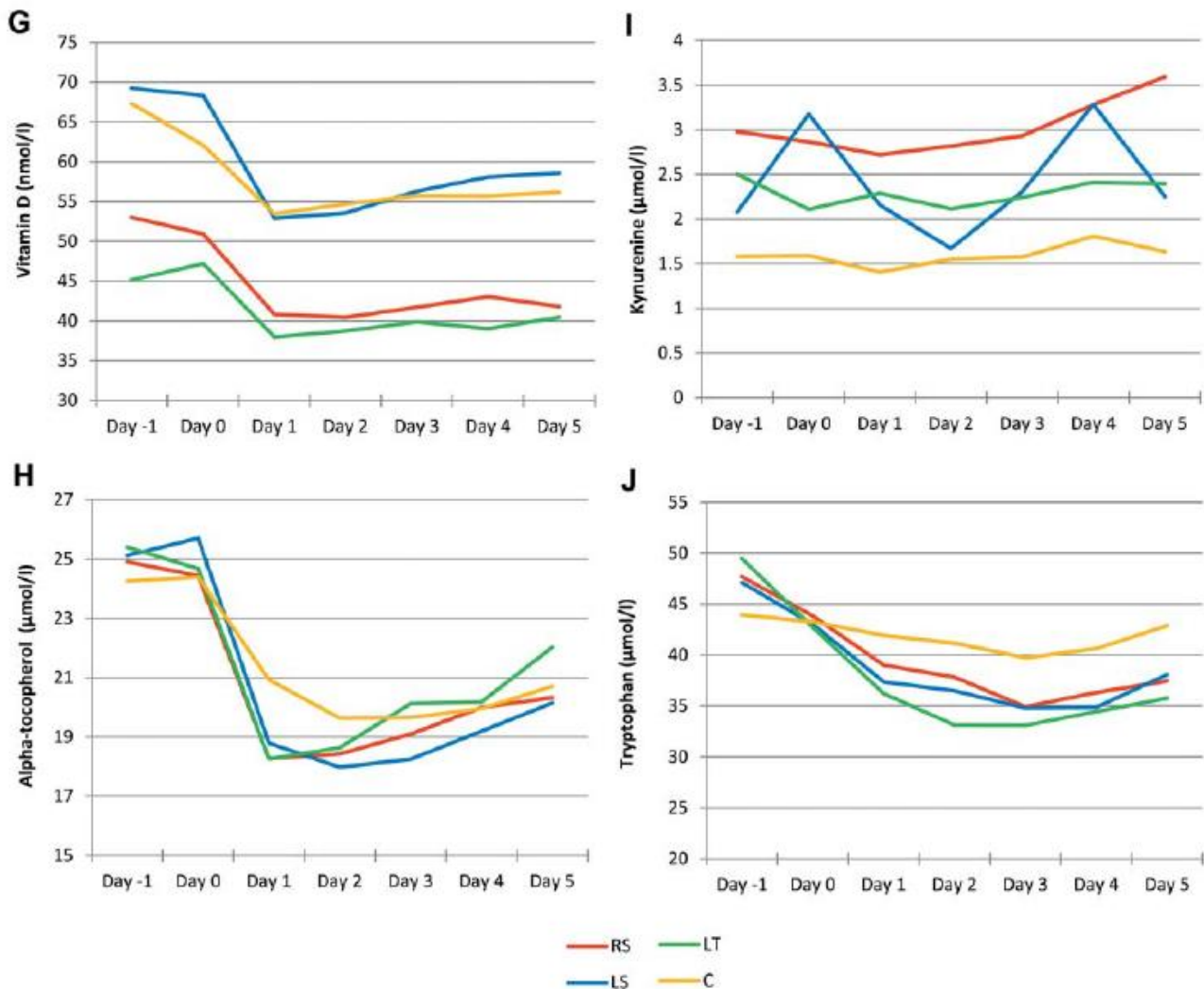


Figure 1. A: Changes of hemoglobin concentrations in the perioperative period in the robotic (RS), laparoscopic surgery (LS), open laparotomy (LT) and control (C) groups of patients. B: Peripheral blood leukocyte counts during the perioperative period in the robotic surgery (RS), laparoscopic surgery (LS), open laparotomy (LT) and control (C) groups of patients. C: Platelet counts during the perioperative period in the robotic surgery (RS), laparoscopic surgery (LS), open laparotomy (LT) and control (C) groups of patients. D: CRP concentrations throughout the perioperative period in all four groups. E: IL-6 concentrations throughout the perioperative period in all four groups. F: Citrulline concentrations during the perioperative period in the robotic surgery (RS), laparoscopic surgery (LS), open laparotomy (LT) and control (C) groups of patients. G: Vitamin D concentrations during the perioperative period in all four groups. H: Alpha-tocopherol concentrations throughout the perioperative period in the robotic surgery (RS), laparoscopic surgery (LS), open laparotomy (LT) and control (C) groups of patients. I: Retinol concentrations during the perioperative period in the robotic surgery (RS), laparoscopic surgery (LS), open laparotomy (LT) and control (C) groups of patients. J: Kynurenine concentrations during the perioperative period in all four groups. K: Tryptophan concentrations throughout the perioperative period in the robotic surgery (RS), laparoscopic surgery (LS), open laparotomy (LT) and control (C) groups of patients.

course in the RS, LS and LT groups, but not in controls (Figure 1K). The kynurenine/tryptophan ratio was significantly increased between days 3 and 5 in the RS group and on days 2 to 5 in the LT group and on day 4 in the control group, but not in the LS group (Figure 1L). The urinary neopterin/creatinine ratio did not exhibit significant changes in any of the groups examined (Figure 1M).

AUC of hemoglobin was significantly higher in RS compared to LT group. AUC of CRP and interleukin-6 were significantly higher in RS and LT compared to LS group and controls, as well as in LS compared to RS. AUC of vitamin D was significantly lower in LT compared to the LS patients, while AUC of retinol was significantly lower in RS compared to the LS group. The AUC of urinary

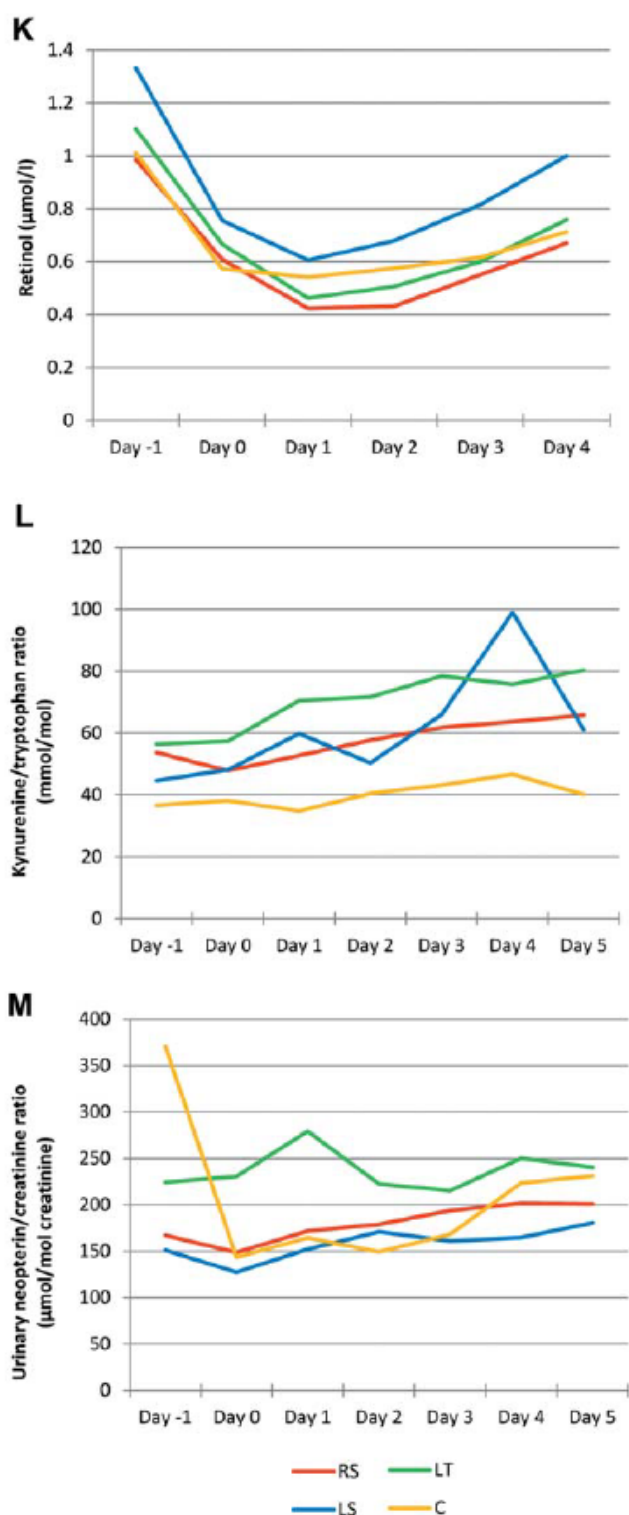


Figure 1. L: The kynurenine/tryptophan ratio during the perioperative period in the robotic surgery (RS), laparoscopic surgery (LS), open laparotomy (LT) and control (C) groups of patients. M: The urinary neopterin/creatinine ratio during the perioperative period in all four groups.

neopterin/creatinine ratio was significantly higher in LT compared to LS patients (Table III).

Table IV shows the correlations between investigated biomarkers of nutrition and inflammatory response at baseline in patients with EC. CRP and IL-6 correlated with each other and exhibited positive correlation with age, BMI, leukocyte count, platelet count, kynurenine, kynurenine/tryptophan ratio and urinary neopterin and a negative correlation with vitamin D and retinol. In addition, IL-6 correlated positively with citrulline. Beside the correlation with CRP and IL-6, urinary neopterin correlated positively with age, kynurenine and kynurenine/tryptophan ratio and negatively with vitamin D and retinol. In addition to the correlations mentioned, kynurenine and kynurenine/tryptophan ratio correlated positively with age and citrulline, while kynurenine correlated with BMI.

In controls, CRP correlated positively with IL-6 and negatively with vitamin D concentrations. IL-6 correlated significantly in a positive manner with urinary neopterin and serum kynurenine/tryptophan ratio and negatively with serum tryptophan concentrations. Urinary neopterin/creatinine ratio correlated positively with serum kynurenine concentrations and kynurenine/tryptophan ratios (Table V).

In general, a similar pattern of correlations was observed when AUC values of biomarkers were correlated in EC patients (Table VI) and controls (Table VII) with the exception of a negative correlation being observed between CRP and citrulline in these patients.

Table VIII shows the correlation between the clinical indicators of surgical stress and AUC of investigated biomarkers of nutrition and inflammatory response in patients with EC. Blood loss correlated positively with AUC of kynurenine. Nadir hemoglobin concentrations exhibited significant negative correlation with the AUC of CRP, interleukin-6 and kynurenine/tryptophan ratio and a positive correlation with AUC of vitamin D, alpha-tocopherol, retinol and tryptophan. Decreased hemoglobin concentrations showed a significant negative correlation with AUC of platelet count and alpha-tocopherol. VAS correlated positively with CRP. The number of removed lymph nodes correlated positively with AUC of tryptophan and negatively with AUC of urinary neopterin/creatinine ratio. In the control group, only a significant inverse correlation between CRP and nadir hemoglobin concentration ($r_s=-0.405$; $p=0.049$) and a positive correlation between citrulline and decrease of hemoglobin concentration ($r_s=0.422$; $p=0.040$) were observed.

Discussion

The present data demonstrate significant changes in the investigated biomarkers of nutrition and inflammatory response in the acute postsurgical phase in patients with EC.

Table III. Comparison of AUC of investigated parameters between the groups of patients.

Parameter	Mean±SD (range)				p-Value	p-Value (post hoc tests)					
	Robotic surgery (RS)	Laparoscopy (LS)	Laparotomy (LT)	Controls (C)		RS vs. C	LS vs. C	LT vs. C	RS vs. LS	RS vs. LT	LS vs. LT
Hemoglobin (g/l)	695±70 (498-844)	679±81 (535-801)	647.2±59 (507-762)	701±85 (568-847)	0.012 ^b	1.000	1.000	0.066	1.000	0.012	1.000
Leukocytes (10 ⁹ /l)	51.7±16 (29.9-102.8)	47.1±10.8 (27.4-67.7)	55.4±13.8 (34.8-93.8)	50.0±11.5 (29.7-83.5)	0.231 ^b						
Platelets (10 ⁹ /l)	1359±469 (309-3198)	1307±276 (1060-1998)	1467±386 (643-2269)	1374±284 (674-1997)	0.214 ^b						
CRP (mg/l)	249.6±193.2 (39.2-1014.8)	138.9±68.4 (35.3-288)	402.6±262 (69.3-1320)	128.2±70.9 (26.8-301)	<0.0001 ^b	0.002	1.000	<0.0001	0.041	0.0004	<0.0001
IL-6 (ng/l)	224.5±484.6 (32.6-3884)	85.0±36.7 (27.7-158.2)	372.4±530.5 (65.4-2859)	84.6±50.6 (30.2-238)	<0.0001 ^b	0.0006	1.000	<0.0001	0.011	0.023	0.0002
Citrulline (µmol/l)	135.6±33.6 (68.5-263.0)	133.3±23.9 (94.5-164.5)	134.2±34.3 (71.5-220.0)	134.5±32.2 (67-233.5)	0.986 ^b						
Vitamin D (nmol/l)	260.6 ±127.3 (5.9-686.3)	349.3±144.9 (140.4-749.7)	241.3±125.2 (80.2-734.1)	343.3±169.4 (125.6-717.4)	0.010 ^b	0.241	1.000	0.069	0.141	1.000	0.034
Alpha-tocopherol (µmol/l)	122.8±27.4 (67.7-205.2)	122.5±27.0 (88.7-183.5)	125.6±28.2 (93.1-195.3)	127.0±22.4 (89.3-162.5)	0.880 ^b						
Retinol (µmol/l)	3.9±1.3 (0.2-7.2)	5.4±1.6 (2.0-7.8)	4.3±1.8 (1.3-9.1)	4.2±1.5 (2.1-7.7)	0.017 ^b	1.000	0.114	1.000	0.006	1.000	0.259
Kynurenine (µmol/l)	12.8±5.4 (3.3-34.5)	12.8±4.8 (6.4-22.7)	13.7±4.2 (5.6-26.6)	9.5±2.2 (5.2-15.9)	0.0006 ^b	0.015	0.129	0.0001	1.000	0.765	1.000
Tryptophan (µmol/l)	234.1±48.8 (67.5-343.9)	226.5±37.4 (173.4-294.9)	218.1±67.1 (44.9-355.8)	250.1±53.5 (97.3-325.3)	0.230 ^b						
Kynurenine/tryptophan ratio (mmol/mol)	333.9±143.6 (98.6-931.8)	311.6±73.7 (184.3-466.5)	409.4±227.3 (145-1301.8)	241.5±69.6 (125.4-438.0)	0.0005 ^b	0.007	0.027	0.0007	1.000	0.564	1.000
Urinary neopterin/creatinine ratio (µmol/mol creatinine)	1077±482 (458-3378)	930±317 (561-1574)	1412.5±773 (519-4364)	1151±541 (422-2723)	0.022 ^b	1.000	1.000	0.620	1.000	0.059	0.042

^bKruskal-Wallis test.

In addition, the biomarkers of nutrition and inflammatory response correlated significantly with clinical parameters of surgical stress.

There were some remarkable baseline differences among the groups of patients investigated reflecting the presence of tumor and associated risk factors like age or BMI. Baseline parameters of inflammatory response were higher in patients with endometrial cancer scheduled for LT and RS, possibly insinuating higher tumor load. Interestingly, baseline differences were also evident between EC patients selected for different surgical approaches that may imply an association with constitutive factors like BMI or nutritional status. The differences in tumor burden can explain the baseline differences in CRP and IL-6 concentrations in EC patients scheduled for different surgical approaches. As expected, kynurenine concentrations were also significantly higher in all groups of EC patients compared to controls; however, no difference was observed in urinary neopterin concentrations, probably

reflecting the early stage of cancer. Urinary neopterin concentrations are known to be increased in EC patients (9) but, similarly to other tumors, neopterin concentrations increase with stage. In patients with early disease, increased concentrations are observed only in a minority of patients. Moreover, neopterin concentrations in the control group were rather high.

Neopterin is a non-specific biomarker of immune activation and, in addition to cancer, increased neopterin concentrations have been observed in a wide range of non-neoplastic conditions, including acute myocardial infarction (10) or increased age (11). In cancer patients, increased neopterin concentrations are associated with poor prognosis (9). Increased neopterin production has been linked to phenotypic changes of the leukocyte population associated with down-regulation of the immune response (12-14). Metabolism of tryptophan to kynurenine may, theoretically, both inhibit and stimulate tumor growth. Tryptophan depletion induces cytostasis in tumor cells (15) and

Table IV. Correlations between laboratory and clinical parameters at baseline in patients with endometrial carcinoma (n= 109).

EC (n=109)	Age	BMI	Leuko- cytes -1	Platelets -1	CRP -1	IL-6 -1	Citru- lline -1	Vitamin D-1	Alpha- toco- pherol -1	Retinol -1	Kynure- nine -1	Urinary neopterin/ creatinine ratio-1	Trypto- phan -1	Kynurenine/ Trypto- phan ratio-1
Age														
Corr. Coef.	1.000	0.161	0.093	-0.159	0.314	0.418	0.324	-0.098	-0.087	-0.235	0.276	0.217	-0.167	0.332
Sig.		0.095	0.336	0.098	0.001	<0.0001	0.001	0.313	0.369	0.014	0.004	0.025	0.088	0.0005
BMI														
Corr. Coef.	0.161	1.000	0.142	0.053	0.405	0.452	0.117	-0.208	-0.020	0.101	0.275	0.114	0.072	0.168
Sig.	0.095		0.141	0.588	<0.0001	<0.0001	0.225	0.032	0.835	0.297	0.004	0.243	0.464	0.085
Leukocytes-1														
Corr. Coef.	0.093	0.142	1.000	0.464	0.299	0.281	-0.051	-0.169	0.120	0.096	0.008	-0.030	0.053	0.046
Sig.	0.336	0.141		0.000	0.002	0.003	0.599	0.082	0.213	0.322	0.933	0.762	0.587	0.643
Platelets-1														
Corr. Coef.	-0.159	0.053	0.464	1.000	0.282	0.240	0.018	-0.084	0.150	0.016	0.004	-0.131	0.005	0.014
Sig.	0.098	0.588	0.000		0.003	0.012	0.856	0.392	0.121	0.865	0.967	0.178	0.961	0.889
CRP -1														
Corr. Coef.	0.314	0.405	0.299	0.282	1.000	0.751	0.106	-0.206	0.071	-0.214	0.295	0.294	-0.092	0.326
Sig.	0.001	<0.0001	0.002	0.003		<0.0001	0.272	0.033	0.466	0.026	0.002	0.002	0.351	0.001
IL-6 -1														
Corr. Coef.	0.418	0.452	0.281	0.240	0.751	1.000	0.250	-0.324	0.021	-0.237	0.418	0.389	-0.141	0.497
Sig.	<0.0001	<0.0001	0.003	0.012	<0.0001		0.009	0.001	0.830	0.013	<0.0001	<0.0001	0.151	<0.0001
Citrulline-1														
Corr. Coef.	0.324	0.117	-0.051	0.018	0.106	0.250	1.000	-0.073	0.019	-0.080	0.301	0.092	0.003	0.275
Sig.	0.001	0.225	0.599	0.856	0.272	0.009		0.456	0.845	0.408	0.002	0.347	0.979	0.004
Vitamin D-1														
Corr. Coef.	-0.098	-0.208	-0.169	-0.084	-0.206	-0.324	-0.073	1.000	0.112	0.136	-0.117	-0.229	0.117	-0.214
Sig.	0.313	0.032	0.082	0.392	0.033	0.001	0.456		0.250	0.163	0.230	0.018	0.234	0.028
Alpha-tocopherol-1														
Corr. Coef.	-0.087	-0.020	0.120	0.150	0.071	0.021	0.019	0.112	1.000	0.254	-0.096	-0.031	-0.128	-0.009
Sig.	0.369	0.835	0.213	0.121	0.466	0.830	0.845	0.250		0.008	0.321	0.749	0.189	0.926
Retinol-1														
Corr. Coef.	-0.235	0.101	0.096	0.016	-0.214	-0.237	-0.080	0.136	0.254	1.000	-0.130	-0.236	0.110	-0.179
Sig.	0.014	0.297	0.322	0.865	0.026	0.013	0.408	0.163	0.008		0.182	0.014	0.262	0.067
Kynurenine-1														
Corr. Coef.	0.276	0.275	0.008	0.004	0.295	0.418	0.301	-0.117	-0.096	-0.130	1.000	0.205	0.236	0.709
Sig.	0.004	0.004	0.933	0.967	0.002	<0.0001	0.002	0.230	0.321	0.182		0.034	0.015	<0.0001
Urinary neopterin/ creatinine ratio-1														
Corr. Coef.	0.217	0.114	-0.030	-0.131	0.294	0.389	0.092	-0.229	-0.031	-0.236	0.205	1.000	-0.257	0.359
Sig.	0.025	0.243	0.762	0.178	0.002	<0.0001	0.347	0.018	0.749	0.014	0.034		0.008	0.0002
Tryptophan-1														
Corr. Coef.	-0.167	0.072	0.053	0.005	-0.092	-0.141	0.003	0.117	-0.128	0.110	0.236	-0.257	1.000	-0.438
Sig.	0.088	0.464	0.587	0.961	0.351	0.151	0.979	0.234	0.189	0.262	0.015	0.008		<0.0001
Kynurenine/ Tryptophan ratio-1														
Corr. Coef.	0.332	0.168	0.046	0.014	0.326	0.497	0.275	-0.214	-0.009	-0.179	0.709	0.359	-0.438	1.000
Sig.	0.0005	0.085	0.643	0.889	0.001	<0.0001	0.004	0.028	0.926	0.067	<0.0001	0.0002	<0.0001	

Parameter -1 (Leukocytes-1; Platelets-1, *etc.*) shows sample taken the day before surgery (day -1), as explained in the Materials and Methods section. BMI, body mass index; EC, endometrial cancer patients.

kynurenine has been reported to have antitumor activity at high concentration (16); however, it is now thought that tryptophan metabolism to kynurenine promotes tumor growth through the suppression of the antitumor immune response (17).

As expected, a significant correlation was observed between different biomarkers of inflammatory phenomena. However, in contrast to increasing concentrations of IL-6, CRP and kynurenine/tryptophan ratio, no significant increase was evident in urinary neopterin concentrations.

Table V. Correlations between laboratory and clinical parameters at baseline in the control group (n=24).

C (n=24)	Age	BMI	Leuko- cytes -1	Platelets -1	CRP -1	IL-6 -1	Citru- lline -1	Vitamin D-1	Alpha- toco- pherol -1	Retinol -1	Kynure- nine -1	Urinary neopterin/ creatinine ratio-1	Trypto- phan -1	Kynurenine/ Trypto- phan ratio-1
Age														
Corr. Coef.	1.000	-0.390	0.002	-0.065	-0.009	-0.013	-0.203	0.441	0.012	-0.193	0.129	-0.087	-0.101	0.217
Sig.		0.060	0.992	0.764	0.968	0.952	0.342	0.031	0.956	0.367	0.548	0.687	0.640	0.308
BMI														
Corr. Coef.	-0.390	1.000	0.322	0.255	0.596	0.196	-0.016	-0.376	-0.423	0.153	0.387	-0.152	0.366	0.121
Sig.	0.060		0.125	0.228	0.002	0.358	0.941	0.070	0.040	0.476	0.062	0.478	0.079	0.572
Leukocytes-1														
Corr. Coef.	0.002	0.322	1.000	0.039	0.312	0.464	0.249	-0.080	-0.193	0.082	0.325	0.135	0.255	0.020
Sig.	0.992	0.125		0.857	0.138	0.022	0.240	0.710	0.366	0.704	0.121	0.530	0.230	0.926
Platelets-1														
Corr. Coef.	-0.065	0.255	0.039	1.000	0.281	0.140	-0.136	-0.071	-0.152	-0.335	0.479	-0.203	0.247	0.247
Sig.	0.764	0.228	0.857		0.184	0.514	0.525	0.742	0.478	0.109	0.018	0.342	0.245	0.245
CRP-1														
Corr. Coef.	-0.009	0.596	0.312	0.281	1.000	0.602	0.089	-0.072	-0.330	0.139	0.753	0.142	0.369	0.364
Sig.	0.968	0.002	0.138	0.184		0.002	0.681	0.739	0.115	0.516	<0.0001	0.508	0.076	0.080
IL-6-1														
Corr. Coef.	-0.013	0.196	0.464	0.140	0.602	1.000	0.078	-0.172	-0.016	0.055	0.453	0.487	0.125	0.164
Sig.	0.952	0.358	0.022	0.514	0.002		0.717	0.422	0.940	0.800	0.026	0.016	0.560	0.443
Citrulline-1														
Corr. Coef.	-0.203	-0.016	0.249	-0.136	0.089	0.078	1.000	-0.078	0.072	0.068	0.144	-0.112	0.138	0.061
Sig.	0.342	0.941	0.240	0.525	0.681	0.717		0.718	0.737	0.752	0.502	0.603	0.519	0.777
Vitamin D-1														
Corr. Coef.	0.441	-0.376	-0.080	-0.071	-0.072	-0.172	-0.078	1.000	0.271	-0.157	-0.021	-0.013	0.170	-0.126
Sig.	0.031	0.070	0.710	0.742	0.739	0.422	0.718		0.200	0.465	0.923	0.952	0.426	0.557
Alpha-tocopherol-1														
Corr. Coef.	0.012	-0.423	-0.193	-0.152	-0.330	-0.016	0.072	0.271	1.000	0.151	-0.368	0.040	-0.015	-0.403
Sig.	0.956	0.040	0.366	0.478	0.115	0.940	0.737	0.200		0.483	0.077	0.853	0.945	0.051
Retinol-1														
Corr. Coef.	-0.193	0.153	0.082	-0.335	0.139	0.055	0.068	-0.157	0.151	1.000	-0.301	0.240	-0.087	-0.256
Sig.	0.367	0.476	0.704	0.109	0.516	0.800	0.752	0.465	0.483		0.153	0.259	0.687	0.228
Kynurenine-1														
Corr. Coef.	0.129	0.387	0.325	0.479	0.753	0.453	0.144	-0.021	-0.368	-0.301	1.000	0.008	0.357	0.680
Sig.	0.548	0.062	0.121	0.018	<0.0001	0.026	0.502	0.923	0.077	0.153		0.971	0.087	0.0003
Urinary neopterin/ creatinine ratio-1														
Corr. Coef.	-0.087	-0.152	0.135	-0.203	0.142	0.487	-0.112	-0.013	0.040	0.240	0.008	1.000	-0.328	0.160
Sig.	0.687	0.478	0.530	0.342	0.508	0.016	0.603	0.952	0.853	0.259	0.971		0.118	0.455
Tryptophan-1														
Corr. Coef.	-0.101	0.366	0.255	0.247	0.369	0.125	0.138	0.170	-0.015	-0.087	0.357	-0.328	1.000	-0.312
Sig.	0.640	0.079	0.230	0.245	0.076	0.560	0.519	0.426	0.945	0.687	0.087	0.118		0.138
Kynurenine/ Tryptophan ratio-1														
Corr. Coef.	0.217	0.121	0.020	0.247	0.364	0.164	0.061	-0.126	-0.403	-0.256	0.680	0.160	-0.312	1.000
Sig.	0.308	0.572	0.926	0.245	0.080	0.443	0.777	0.557	0.051	0.228	0.0003	0.455	0.138	

Parameter -1 (Leukocytes-1; Platelets-1, etc.) shows sample taken the day before surgery (day -1), as explained in the Materials and Methods section. BMI, body mass index; C, control group.

Increased concentrations of biomarkers of inflammation during the postoperative course were associated with decreasing hemoglobin concentrations and rising leukocyte counts. A concept of AUC of biomarkers during the perioperative course was introduced to assess the longitudinal behavior. As expected, the clinical parameters reflective of

surgical trauma, specifically blood loss, differed significantly among the surgical approaches. These differences further accentuated differences in biomarkers of inflammatory biomarkers observed at baseline. A significant correlation was observed between blood loss and biomarkers of inflammatory response.

Table VI. Correlations between AUC of laboratory parameters in patients with endometrial carcinoma (n=109).

EC (n=109)	Age	BMI	Leuko- cytes	Platelets	CRP	IL-6	Citru- lline	Vitamin D	Alpha- toco- pherol	Retinol	Kynure- nine	Urinary neopterin/ creatinine ratio	Trypto- phan	Kynurenine/ Tryptophan ratio
Age														
Corr. Coef.	1.000	0.161	0.178	-0.121	0.214	0.316	0.162	-0.096	-0.057	-0.237	0.286	0.408	-0.037	0.253
Sig.		0.095	0.064	0.208	0.025	0.001	0.092	0.321	0.556	0.013	0.003	<0.0001	0.702	0.008
BMI														
Corr. Coef.	0.161	1.000	0.098	-0.040	0.338	0.229	0.008	-0.220	-0.024	0.088	0.299	0.228	-0.044	0.218
Sig.	0.095		0.311	0.682	0.0003	0.016	0.937	0.021	0.804	0.366	0.002	0.017	0.647	0.023
Leukocytes														
Corr. Coef.	0.178	0.098	1.000	0.337	0.319	0.239	-0.127	-0.227	0.036	-0.043	-0.101	0.164	-0.016	-0.081
Sig.	0.064	0.311		0.0003	0.001	0.012	0.190	0.018	0.710	0.654	0.298	0.089	0.869	0.404
Platelets														
Corr. Coef.	-0.121	-0.040	0.337	1.000	0.157	0.034	-0.026	-0.073	0.272	0.040	-0.138	0.025	-0.182	-0.071
Sig.	0.208	0.682	0.0003		0.103	0.727	0.788	0.449	0.004	0.681	0.153	0.796	0.058	0.463
CRP														
Corr. Coef.	0.214	0.338	0.319	0.157	1.000	0.683	-0.254	-0.248	-0.034	-0.120	0.117	0.502	-0.189	0.244
Sig.	0.025	0.0003	0.001	0.103		<0.0001	0.008	0.009	0.728	0.216	0.225	<0.0001	0.049	0.011
IL-6														
Corr. Coef.	0.316	0.229	0.239	0.034	0.683	1.000	-0.081	-0.326	-0.252	-0.310	0.156	0.449	-0.213	0.300
Sig.	0.001	0.016	0.012	0.727	<0.0001		0.405	0.001	0.008	0.001	0.104	<0.0001	0.026	0.002
Citrulline														
Corr. Coef.	0.162	0.008	-0.127	-0.026	-0.254	-0.081	1.000	-0.151	0.045	0.007	0.138	-0.102	-0.110	0.127
Sig.	0.092	0.937	0.190	0.788	0.008	0.405		0.118	0.641	0.944	0.152	0.289	0.254	0.188
Vitamin D														
Corr. Coef.	-0.096	-0.220	-0.227	-0.073	-0.248	-0.326	-0.151	1.000	0.117	0.217	-0.119	-0.196	0.211	-0.275
Sig.	0.321	0.021	0.018	0.449	0.009	0.001	0.118		0.228	0.024	0.219	0.041	0.028	0.004
Alpha-tocopherol														
Corr. Coef.	-0.057	-0.024	0.036	0.272	-0.034	-0.252	0.045	0.117	1.000	0.307	-0.118	-0.078	0.059	-0.147
Sig.	0.556	0.804	0.710	0.004	0.728	0.008	0.641	0.228		0.001	0.221	0.423	0.542	0.128
Retinol														
Corr. Coef.	-0.237	0.088	-0.043	0.040	-0.120	-0.310	0.007	0.217	0.307	1.000	0.001	-0.180	0.146	-0.177
Sig.	0.013	0.366	0.654	0.681	0.216	0.001	0.944	0.024	0.001		0.995	0.061	0.130	0.065
Kynurenine														
Corr. Coef.	0.286	0.299	-0.101	-0.138	0.117	0.156	0.138	-0.119	-0.118	0.001	1.000	0.089	0.154	0.649
Sig.	0.003	0.002	0.298	0.153	0.225	0.104	0.152	0.219	0.221	0.995		0.360	0.111	<0.0001
Urinary neopterin/ creatinine ratio														
Corr. Coef.	0.408	0.228	0.164	0.025	0.502	0.449	-0.102	-0.196	-0.078	-0.180	0.089	1.000	-0.401	0.386
Sig.	<0.0001	0.017	0.089	0.796	<0.0001	<0.0001	0.289	0.041	0.423	0.061	0.360		<0.0001	<0.0001
Tryptophan														
Corr. Coef.	-0.037	-0.044	-0.016	-0.182	-0.189	-0.213	-0.110	0.211	0.059	0.146	0.154	-0.401	1.000	-0.460
Sig.	0.702	0.647	0.869	0.058	0.049	0.026	0.254	0.028	0.542	0.130	0.111	<0.0001		<0.0001
Kynurenine/ Tryptophan ratio														
Corr. Coef.	0.253	0.218	-0.081	-0.071	0.244	0.300	0.127	-0.275	-0.147	-0.177	0.649	0.386	-0.460	1.000
Sig.	0.008	0.023	0.404	0.463	0.011	0.002	0.188	0.004	0.128	0.065	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

EC, Endometrial cancer patients; BMI, body mass index.

A decrease of plasma citrulline concentration, a biomarker of gut mass, was more pronounced in patients undergoing surgery for endometrial carcinoma compared to patients operated for benign disease. The decrease of citrulline in patients undergoing surgery is of significance because citrulline represents a biomarker of gastrointestinal toxicity of chemoradiation in

cancer patients (8). Adjuvant therapy in patients with high-risk endometrial carcinoma consists of systemic chemotherapy and radiation; thus, recovery of gut function may be of significance for the planning of postoperative therapy. Surgery was also uniformly associated with a decrease of circulating concentrations of retinol, alpha-tocopherol and vitamin D,

Table VII. Correlations between AUC of laboratory parameters in controls (n=24).

C (n=24)	Age	BMI	Leuko- cytes	Platelets	CRP	IL-6	Citru- lline	Vitamin D	Alpha- toco- pherol	Retinol	Kynure- nine	Urinary neopterin/ creatinine ratio	Trypto- phan	Kynurenine/ Tryptophan ratio
Age														
Corr. Coef.	1.000	-0.390	0.065	-0.017	0.017	0.293	0.141	0.434	0.015	-0.244	0.017	-0.078	-0.225	0.254
Sig.		0.060	0.763	0.936	0.937	0.164	0.512	0.034	0.945	0.251	0.937	0.719	0.290	0.230
BMI														
Corr. Coef.	-0.390	1.000	0.669	0.471	0.117	-0.280	0.137	-0.389	-0.202	0.446	0.070	-0.243	0.321	-0.152
Sig.	0.060		0.0003	0.020	0.586	0.186	0.524	0.060	0.343	0.029	0.745	0.252	0.126	0.478
Leukocytes														
Corr. Coef.	0.065	0.669	1.000	0.423	-0.037	-0.110	0.267	-0.118	-0.130	0.194	0.212	-0.157	0.136	0.040
Sig.	0.763	0.0003		0.039	0.865	0.610	0.208	0.582	0.544	0.364	0.320	0.463	0.527	0.853
Platelets														
Corr. Coef.	-0.017	0.471	0.423	1.000	0.030	-0.201	0.035	-0.158	-0.197	0.066	0.310	-0.245	0.407	-0.091
Sig.	0.936	0.020	0.039		0.891	0.347	0.870	0.460	0.355	0.759	0.140	0.248	0.048	0.671
CRP														
Corr. Coef.	0.017	0.117	-0.037	0.030	1.000	0.655	-0.056	-0.498	-0.236	0.076	0.037	0.141	-0.290	0.216
Sig.	0.937	0.586	0.865	0.891		0.001	0.796	0.013	0.268	0.725	0.865	0.511	0.170	0.312
IL-6														
Corr. Coef.	0.293	-0.280	-0.110	-0.201	0.655	1.000	0.002	-0.366	-0.152	-0.202	0.116	0.405	-0.462	0.415
Sig.	0.164	0.186	0.610	0.347	0.001		0.992	0.079	0.478	0.344	0.590	0.049	0.023	0.044
Citrulline														
Corr. Coef.	0.141	0.137	0.267	0.035	-0.056	0.002	1.000	-0.203	-0.125	0.049	0.395	-0.020	0.020	0.264
Sig.	0.512	0.524	0.208	0.870	0.796	0.992		0.342	0.561	0.821	0.056	0.926	0.926	0.213
Vitamin D														
Corr. Coef.	0.434	-0.389	-0.118	-0.158	-0.498	-0.366	-0.203	1.000	0.319	0.033	-0.053	-0.117	0.026	-0.134
Sig.	0.034	0.060	0.582	0.460	0.013	0.079	0.342		0.129	0.878	0.806	0.585	0.904	0.533
Alpha-tocopherol														
Corr. Coef.	0.015	-0.202	-0.130	-0.197	-0.236	-0.152	-0.125	0.319	1.000	0.317	-0.067	-0.228	0.365	-0.299
Sig.	0.945	0.343	0.544	0.355	0.268	0.478	0.561	0.129		0.131	0.756	0.284	0.079	0.156
Retinol														
Corr. Coef.	-0.244	0.446	0.194	0.066	0.076	-0.202	0.049	0.033	0.317	1.000	0.123	0.035	0.310	-0.028
Sig.	0.251	0.029	0.364	0.759	0.725	0.344	0.821	0.878	0.131		0.565	0.872	0.141	0.897
Kynurenine														
Corr. Coef.	0.017	0.070	0.212	0.310	0.037	0.116	0.395	-0.053	-0.067	0.123	1.000	0.456	0.050	0.555
Sig.	0.937	0.745	0.320	0.140	0.865	0.590	0.056	0.806	0.756	0.565		0.025	0.815	0.005
Urinary neopterin/ creatinine ratio														
Corr. Coef.	-0.078	-0.243	-0.157	-0.245	0.141	0.405	-0.020	-0.117	-0.228	0.035	0.456	1.000	-0.337	0.585
Sig.	0.719	0.252	0.463	0.248	0.511	0.049	0.926	0.585	0.284	0.872	0.025		0.108	0.003
Tryptophan														
Corr. Coef.	-0.225	0.321	0.136	0.407	-0.290	-0.462	0.020	0.026	0.365	0.310	0.050	-0.337	1.000	-0.707
Sig.	0.290	0.126	0.527	0.048	0.170	0.023	0.926	0.904	0.079	0.141	0.815	0.108		0.0001
Kynurenine/ Tryptophan ratio														
Corr. Coef.	0.254	-0.152	0.040	-0.091	0.216	0.415	0.264	-0.134	-0.299	-0.028	0.555	0.585	-0.707	1.000
Sig.	0.230	0.478	0.853	0.671	0.312	0.044	0.213	0.533	0.156	0.897	0.005	0.003	0.0001	

C, Control group; BMI, body mass index.

possibly reflecting the decreased function of gut mucosa. The decrease of circulating concentrations of antioxidant vitamins is of importance for supportive care.

Neoplastic disorders and antitumor therapy are associated with oxidative stress (18-20). The disorders of antioxidant balance may play a role in the toxicity of anticancer

treatment. Vitamin E represents a major antioxidant in the serum (21). Although the term vitamin E denotes several naturally occurring tocopherols and tocotrienols, alpha-tocopherol is responsible for most of the activity of vitamin E (21). Disorders of antioxidant balance, involving alpha-tocopherol, may be implicated in the pathogenesis of the

Table VIII. Correlation between the clinical indicators of surgical stress and AUC of investigated biomarkers of nutrition and inflammatory response in patients with endometrial cancer.

EC (n=109)	Blood loss	Nadir hemoglobin concentration	Decrease of hemoglobin concentration	VAS	Number of lymph nodes
Leukocytes					
Corr. Coef.	0.046	0.010	0.036	0.009	-0.074
Sig.	0.635	0.921	0.707	0.929	0.447
Platelets					
Corr. Coef.	-0.065	-0.123	-0.215	0.035	0.005
Sig.	0.502	0.202	0.025	0.716	0.956
CRP					
Corr. Coef.	0.195	-0.177	0.070	0.274	-0.051
Sig.	0.042	0.066	0.468	0.004	0.596
IL-6					
Corr. Coef.	0.219	-0.243	0.091	0.154	-0.074
Sig.	0.022	0.011	0.349	0.109	0.446
Citrulline					
Corr. Coef.	-0.004	-0.036	-0.141	-0.116	-0.053
Sig.	0.965	0.713	0.144	0.229	0.581
Vitamin D					
Corr. Coef.	0.004	0.148	-0.042	-0.184	0.075
Sig.	0.965	0.124	0.667	0.056	0.438
Alpha-tocopherol					
Corr. Coef.	-0.062	0.192	-0.225	-0.147	-0.007
Sig.	0.519	0.045	0.019	0.128	0.945
Retinol					
Corr. Coef.	0.123	0.184	0.024	0.014	-0.057
Sig.	0.201	0.055	0.803	0.887	0.553
Kynurenine					
Corr. Coef.	0.223	0.021	-0.119	0.159	-0.021
Sig.	0.020	0.825	0.217	0.099	0.829
Tryptophan					
Corr. Coef.	0.013	0.263	-0.026	0.045	0.245
Sig.	0.893	0.006	0.788	0.641	0.010
Kynurenine/Tryptophan ratio					
Corr. Coef.	0.174	-0.167	-0.002	0.151	-0.143
Sig.	0.071	0.082	0.982	0.117	0.137
Urinary neopterin/creatinine ratio					
Corr. Coef.	0.118	-0.140	-0.002	0.155	-0.231
Sig.	0.221	0.147	0.984	0.107	0.015

EC, Endometrial cancer patients; VAS, visual analog scale.

toxicity associated with external-beam radiation (22, 23) or chemotherapy (24). In prior studies, a decrease in serum alpha-tocopherol has been observed during the administration of systemic chemotherapy (18, 19, 25, 26). Decrease of serum retinol has also been reported in cancer patients and a correlation between the decrease of alpha-tocopherol and retinol, as well as biomarkers of systemic inflammatory response, *e.g.* CRP, has been observed (27, 28).

In conclusion, the present data demonstrate a differential response to surgical trauma in patients with endometrial carcinoma.

Acknowledgements

This project was supported by research grant IGA MH CR NT13566-4.

References

- 1 Siegel R, Ma J, Zou Z and Jemal A: Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64: 9-29, 2014.
- 2 Childers JM, Brzechffa PR, Hatch KD and Surwit EA: Laparoscopically assisted surgical staging (LASS) of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 51: 33-38, 1993.

- 3 Komblith AB, Huang HQ, Walker JL, Spirtos NM, Rotmensch J and Cella D: Quality of life of patients with endometrial cancer undergoing laparoscopic international federation of gynecology and obstetrics staging compared with laparotomy: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 27: 5337-5342, 2009.
- 4 Marek R, Dzvincuk P, Kudela M, Hambalek P, Maderka M, Zapletalova J and Pilka R: Robot assisted endometrial cancer staging - evaluation the first 100 operations and comparing the first and the last 30 operations. *Ceska Gynekol* 80: 324-332, 2015.
- 5 Yim GW and Kim YT: Robotic surgery in gynecologic cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 24: 14-23, 2012.
- 6 Urbanek L, Solichova D, Melichar B, Dvorak J, Svobodova I and Solich P: Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. *Anal Chim Acta* 573-574: 267-272, 2006.
- 7 Solichova D, Korecka L, Svobodova I, Musil F, Blaha V, Zdansky P and Zadak Z: Development and validation of HPLC method for the determination of alpha-tocopherol in human erythrocytes for clinical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376: 444-447, 2003.
- 8 Zezulova M, Bartouskova M, Hlidkova E, Adam T, Krcmova LK, Cervinkova B, Solichova D, Zlevorova M, Cwiertka K, Friedecky D, Vrana D and Melichar B: Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. *Clin Chem Lab Med* 54: 305-314, 2016.
- 9 Melichar B, Solichová D and Freedman RS: Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *International Journal of Gynecological Cancer* 16: 240-252, 2006.
- 10 Melichar B, Gregor J, Solichova D, Lukes J, Tichy M and Pidman V: Increased urinary neopterin in acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry* 40: 338-339, 1994.
- 11 Solichova D, Juraskova B, Blaha V, Bratova M, Kusalova M, Zdansky P and Zadak Z: Bioanalysis of age-related changes of lipid metabolism in nonagenarians. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24: 1157-1162, 2001.
- 12 Melichar B, Solichova D and Jebavy L: Elevation de la neopterin apres traitement par le facteur stimulant des colonies granulomacrophagiques (GM-CSF). *Presse Medicale* 23: 581, 1994.
- 13 Melichar B, Templin SM, Tomasovic BJ, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Edwards CL, Platsoucas CD and Freedman RS: Effects of intraperitoneal injections of interferon-gamma and interleukin-2 on peritoneal monocytes and dendritic cells. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 38: 631-632, 1997.
- 14 Melichar B, Touskova M, Dvorak J, Jandik P and Kopecky O: The peripheral blood leukocyte phenotype in patients with breast cancer: Effect of doxorubicin/paclitaxel combination chemotherapy. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 23: 163-173, 2001.
- 15 Burke F, Knowles RG, East N and Balkwill FR: The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gamma *in vivo*. *International Journal of Cancer* 60: 115-122, 1995.
- 16 Melichar B, Ferrandina G, Verschraegen CF, Loercher A, Abbruzzese JL and Freedman RS: Growth inhibitory effects of aromatic fatty acids on ovarian tumor cell lines. *Clinical Cancer Research* 4: 3069-3076, 1998.
- 17 Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor AL, Munn DH and Antonia SJ: Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *International Journal of Cancer* 101: 151-155, 2002.
- 18 Faber M, Coudray C, Hida H, Mousseau M and Favier A: Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biological Trace Element Research* 47: 117-123, 1995.
- 19 Faure H, Coudray C, Mousseau M, Ducros V, Douki T, Bianchini F, Cadet J and Favier A: 5-Hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in adriamycin-treated patients. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 979-983, 1996.
- 20 Weijl NI, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, Lentjes EGWM, Berger HM, Cleton FJ and Osanto S: Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Annals of Oncology* 9: 1331-1337, 1998.
- 21 Debier C and Larondelle Y: Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition* 93: 153-174, 2005.
- 22 Delanian S, Porcher R, Balla-Mekias S and Lefaix JL: Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis. *Journal of Clinical Oncology* 21: 2545-2550, 2003.
- 23 Erhola M, Nieminen MM and Ojala A: Human plasma antioxidant capacity during radiotherapy for lung cancer: a clinical study. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 17: 325-330, 1998.
- 24 Pace A, Savarese A, Picardo M, Maresca V, Pacetti U, Del Monte G, Biroccio A, Leonetti C, Jandolo B, Cognetti F and Bove L: Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 21: 927-931, 2003.
- 25 High KP, Legault C, Sinclair JA, Cruz J, Hill K and Hurd DD: Low plasma concentrations of retinol and alpha-tocopherol in hematopoietic stem cell transplant recipients: the effect of mucositis and the risk of infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 1358-1366, 2002.
- 26 Jonas RC, Puckett AB, Jones DP, Griffith DP, Szeszycki EE, Bergman GF, Furr CE, Tyre C, Carlson JL, Galloway JR, Blumberg JB and Ziegler TR: Plasma antioxidant status after high-dose chemotherapy: a randomized trial of parenteral nutrition in bone marrow transplantation patients. *American Journal of Clinical Nutrition* 72: 181-189, 2000.
- 27 Mayland C, Allen KR, Degg TJ and Bennet M: Micronutrient concentrations in patients with malignant disease: effect of the inflammatory response. *Annals of Clinical Biochemistry* 41: 138-141, 2004.
- 28 McMillan DC, Talwar D, Sattar N, Underwood M, O'Reilly DSJ and McArdle C: The relationship between reduced vitamin antioxidant concentrations and the systemic inflammatory response in patients with common solid tumours. *Clinical Nutrition* 21: 161-164, 2002.

Received March 10, 2016
 Revised April 15, 2016
 Accepted April 19, 2016

PŘÍLOHA Č. 6

Publikace – původní vědecká publikace v časopise s IF

Radovan Pilka*, David Neubert, David Stejskal, Gabriela Krejčí, Marek Švesták, Radim Marek, Tomáš Adam, K. Sobkova, Dana Ondrová, Jozef Hambálek, Martin Maděrka, Dagmar Solichová, Lenka Kujovská Krčmová, Lenka Javorska, Bohuslav Melichar

Serum concentrations of TFF3, S100-A11 and AIF-1 in association with systemic inflammatory response, disease stage and nodal involvement in endometrial cancer

<https://doi.org/10.1515/pterid-2018-0003>

received November 10, 2017; accepted January 29, 2018.

Abstract: To compare preoperative intestinal trefoil factor 3 (TFF3), allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) and calgizzarin (S100-A11) serum levels in patients with endometrial cancer, endometrial hyperplasia and in healthy female controls. Serum levels of TFF3, S100-A11 and AIF-1 were analyzed in 98 consecutive patients with histologically verified endometrial cancer, in 43 patients with endometrial hyperplasia diagnosed during hysteroscopy and 24 controls with benign disease. Results were correlated with urinary neopterin/creatinine ratio, serum kynurenine, tryptophan, retinol, alpha-tocopherol, vitamin D, citrulline, C-reactive protein, interleukin-6

and clinical characteristics. S100-A11, and AIF-1 levels were higher in endometrial hyperplasia patients than in controls, and also significantly higher in endometrial cancer than in patients with endometrial hyperplasia. Serum concentrations of TFF3 and S100-A11 were associated with tumor stage and lymph node status. TFF3 exhibited positive correlation with age, IL-6, vitamin D, kynurenine, urinary neopterin/creatinine ratio and kynurenine/tryptophan ratio. S100-A11, as well as AIF-1 correlated positively with IL-6 and TFF3. TFF3, S100-A11 and AIF-1 represent potential biomarkers in patients with endometrial cancer. TFF3 and S100-A11 increase with tumor stage and lymph node involvement, reflecting higher tumor mass that is also associated with increased concentration of biomarkers of immune dysfunction.

*Corresponding author: Radovan Pilka, Department of Obstetrics and Gynecology, Palacky University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, I.P.Pavlova 6, Olomouc, 779 00, Czech Republic, E-mail: radovan.pilka@fnol.cz

David Neubert, Radim Marek, K. Sobkova, Dana Ondrová, Jozef Hambálek, Martin Maděrka: Department of Obstetrics and Gynecology, Palacky University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, I.P.Pavlova 6, Olomouc, 779 00, Czech Republic
David Stejskal, Gabriela Krejčí, Marek Švesták: Department of Laboratory Biochemistry, Central Moravian Hospital Trust, Member of Agel holding, Mathonova 291/1, 79604 Prostějov, Czech Republic
Tomáš Adam: Department of Laboratory Biochemistry, Palacky University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, I.P.Pavlova 6, Olomouc, 779 00, Czech Republic

Dagmar Solichová: Third Department of Medicine-Gerontology and Metabolic Care, University Hospital, Sokolská 581, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic

Lenka Kujovská Krčmová, Lenka Javorska: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Czech Republic

Bohuslav Melichar: Department of Oncology, Palacky University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, I.P.Pavlova 6, Olomouc, 779 00, Czech Republic

Keywords: AIF-1; endometrial cancer; inflammatory response; nodal involvement; S100-A11; TFF3.

Introduction

Endometrial cancer (EC) is the most common cancer of the female genital system [1].

Approximately 75% of cases are diagnosed when the tumor is confined to the uterine corpus, but 15%-20% of these patients experience recurrence after primary surgery with limited response to systemic therapy [2].

Surgical staging as part of the treatment paradigm for endometrial cancer was first supported by the findings from a large prospective surgical-pathological study of patients with clinical stage I and II endometrial carcinoma, conducted by the Gynecologic Oncology Group (GOG) [3]. These findings led to a change in the staging system. In 1988, FIGO replaced an inaccurate clinical staging

system with a more accurate surgical staging, which was most recently revised in 2009 [4]. A complete pelvic and paraaortic lymphadenectomy allows for an accurate evaluation of the disease extent. The information defining the extent of disease enables the physician to recommend adjuvant therapy, minimizing the risk of over- or under-treatment. However, lymphadenectomy is not without risks. Post-operative complications occur more frequently and the extent of lymphadenectomy also impacts on post-operative morbidity rates [5]. An improved identification of high risk patients prior to primary surgical treatment could allow to the omission of lymph node dissection among low risk patients, thus lower risk for surgical complications.

Obesity associated with low-grade chronic inflammation represents an important risk factor for developing endometrial cancer [6]. As the world faces an obesity epidemic and an aging population, the number of cases is expected to rise. The management of cancer patients is increasingly dependent on biomarkers. Circulating proteins are the most commonly investigated cancer biomarkers. For example, among the three mammalian trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) identified so far [7-9], TFF3 was found as the top highly expressed gene in endometrial cancer [10]. Based on published studies TFF3 might prove as marker in monitoring disease course both in neoplastic and inflammatory conditions [11]. Recently, calgizzarin (S100-A11) a novel and relatively unknown member of large family of S100 proteins was found to be highly expressed in uterine tumors as well as in pressure ulcer samples [12, 13]. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is a highly conserved inflammation responsive protein [14, 15]. Besides association with acute and chronic inflammation, AIF-1 is also involved in carcinogenesis [16].

Surgical intervention is followed by an inflammatory response that induces oxidative stress. In a prior study, we have demonstrated that surgical approaches inducing different tissue trauma and blood loss are associated with differential response of biomarkers of inflammatory response, oxidative stress and nutritional status. An inverse correlation between the concentrations of citrulline, a biomarker of bowel mass, and inflammatory response was also demonstrated [17].

The aim of this study was to compare preoperative TFF3, AIP and S100-A11 serum levels in patients with endometrial cancer, endometrial hyperplasia and in healthy female controls. In addition, in patients with endometrial cancer an association with tumor grade, stage and nodal status. Furthermore, we analyzed an association between TFF3, S100-A11, AIP-1 and biomarkers

of inflammatory response, oxidative stress and nutritional balance in endometrial cancer patients treated with three surgical approaches including open (laparotomy), laparoscopic and robotic surgery as well as in patients operated for benign disorders.

Materials and methods

The present prospective study was performed at the University Hospital Olomouc between October 2012 and June 2015.

Informed consent: Informed consent has been obtained from all individuals included in this study.

Ethical approval: The research related to human use has been complied with all the relevant national regulations, institutional policies and in accordance the tenets of the Helsinki Declaration, and has been approved by the authors' institutional review board or equivalent committee.

In total 98 consecutive patients with histologically verified endometrial cancer, aged (mean \pm standard deviation) 65 ± 10 (range 33-88) years, who underwent hysterectomy with bilateral salpingoophorectomy, pelvic and paraaortic lymphadenectomy were included in the study. The surgery was performed by open (laparotomy), robotic or laparoscopic approach. The control group was comprised of 24 patients, aged 55 ± 12 (range 36-80) years, who had elective total hysterectomy for non-malignant disorder and were randomly allocated to either abdominal hysterectomy or laparoscopic assisted hysterectomy for benign disease. Samples of peripheral venous blood were collected on the day of surgery before skin incision. The samples were separated and the sera were stored at -80°C until analysis. Urinary samples with the same timing were collected and stored at -20°C until analysis for urinary neopterin/creatinine ratio determination. Other clinical or laboratory parameters evaluated included patient age, body mass index (BMI), number of lymph nodes obtained, grade, stage of the disease and nodal involvement. BMI was calculated using the standard formula (body weight/height²). The results of changes and correlations of biomarkers of inflammatory response and antioxidant balance in the present cohort were published earlier [18]. The present study expanded the analysis to the measurement of TFF3, S100-A11 and AIP-1 serum concentrations in collected samples. Furthermore, preoperative blood samples were taken in 43 patients aged 63 ± 10 (range 44-97) years diagnosed with endometrial hyperplasia during hysteroscopy. Ninety-one patients, aged 65 ± 9 (range 40-87) years, with negative hysteroscopic

findings represented a control group. The samples, as well as endometrial cancer patient samples from the day 0 (before skin incision) were separated and the sera were all stored at -80°C until analysis for TFF3, S100-A11 and AIF-1. Urinary neopterin/creatinine ratio, serum kynurenine, tryptophan, retinol, alpha-tocopherol and vitamin D were determined by high-performance liquid chromatography as described. Citrulline was measured by flow injection mass spectrometry, serum C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) were determined on Cobas 8000 analyzer (Hitachi, Japan) as described,

The assay for TFF3, S100a11 and AIF-1 was developed by Biovendor (Brno, Czech Republic.). All parameters above were measured with sufficient analytical precision; coefficient of variation (CV) $< 5\%$, CV between series $< 8\%$; and analytical characteristics were superior than those in laboratory sheet. All measurements were made in the same time, using biorobotic analyzer DS2 (Dynex, USA), after centrifugation (aliquoted serum, cooled centrifuge, 4°C , 3500/4 min).

Statistics

Results were quantitatively assessed as mean, median, standard deviation, minimal and maximal value. Differences in age between groups were analyzed using the nonparametric Friedman ANOVA test. Other data were analyzed using the Mann-Whitney with Bonferroni's correction and Kruskal-Wallis tests. The level of significance was set at 5%.

Results

TFF3 serum levels were significantly higher in endometrial cancer patients when compared to controls (Figure 1). S100-A11, and AIF-1 levels were higher in endometrial hyperplasia patients than in controls, and also significantly higher in endometrial cancer than in endometrial hyperplasia patients (Figures 2 and 3). The serum concentrations of TFF3 (Figures 4 and 6), S100-A11 (Figures 5 and 7), but not AIF-1 (data not shown) were associated with tumor stage and lymph node status. The serum concentrations of TFF3, S100-A11 and AIF-1 were not associated with tumor grade (data not shown).

Table 1 shows the correlations between TFF3, S100-A11, AIF-1 and biomarkers of oxidative balance and inflammatory response at in patients with endometrial cancer. TFF3 exhibited positive correlation with age, IL-6,

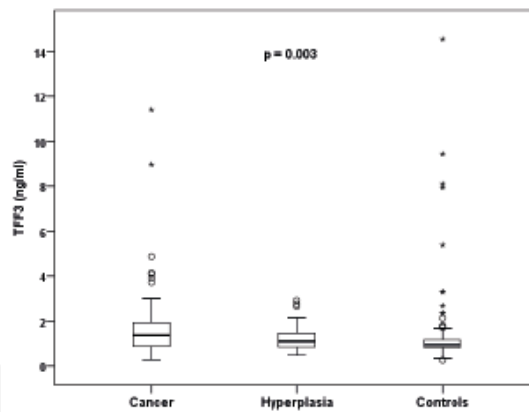


Figure 1: TFF3 serum levels in endometrial cancer (cancer, $n=98$), endometrial hyperplasia (hyperplasia, $n=43$), and normal endometrium (controls, $n=91$) patients.

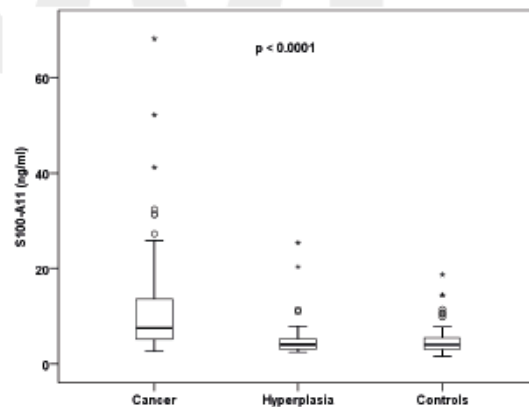


Figure 2: S100-A11 serum levels in endometrial cancer (cancer, $n=98$), endometrial hyperplasia (hyperplasia, $n=43$), and normal endometrium (controls, $n=91$) patients.

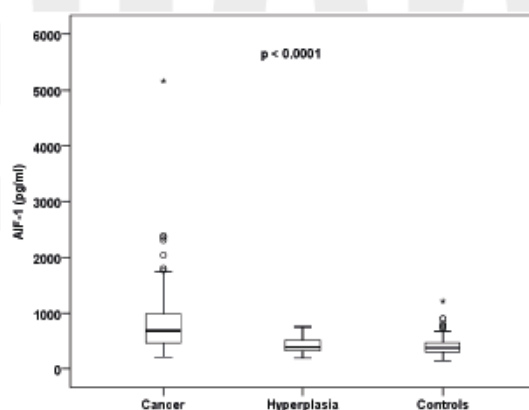


Figure 3: AIF-1 serum levels in endometrial cancer (cancer, $n=98$), endometrial hyperplasia (hyperplasia, $n=43$), and normal endometria (controls, $n=91$) patients.

Table 1: Correlations between laboratory and clinical parameters at baseline in patients with endometrial carcinoma (EC), (n=98), BMI (body mass index), CRP (c-reactive protein), IL-6 (interleukin – 6), TFF3 (intestinal trefoil factor 3), AIF-1 (allograft inflammatory factor-1), S100-A11 (calgizzarin).

EC (n = 98)	Age	BMI	Leuko-Platelets	CRP-1	IL-6-1	Citrulline	Vitamin D-1	Alpha-tocopherol -1	Retinol -1	Kynurenine -1	Urinary neopterin/ creatinine ratio-1	Tryptophan -1	Kynurenine/ Tryptophan ratio-1	TFF3 (ng/ml)	S100-A11 (ng/ml)	AIF-1 (pg/ml)
TFF3 (ng/ml)	Corr. 0.371	0.141	0.088	-0.028	0.176	0.291	0.191	-0.279	0.004	0.312	0.215	-0.047	0.294	1.000	0.311	0.240
	Coef.															
	Sig. 0.0002	NS	NS	NS	NS	0.004	NS	NS	NS	0.002	0.034	NS	0.004	0.002	0.017	0.017
S100-A11 (ng/ml)	Corr. 0.044	0.110	0.130	0.027	0.136	0.200	-0.167	-0.103	-0.105	0.017	0.122	-0.090	0.082	0.311	1.000	0.778
	Coef.															
	Sig. NS	NS	NS	NS	NS	0.049	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.002	<0,0001	<0,0001
AIF-1 (pg/ml)	Corr. 0.061	0.185	0.181	-0.035	.213*	0.253	-0.146	-0.050	-0.065	0.098	0.198	-0.080	0.157	0.240	0.778	1.000
	Coef.															
	Sig. NS	NS	NS	NS	NS	0.012	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.017	<0.0001	<0.0001

NS: not significant.

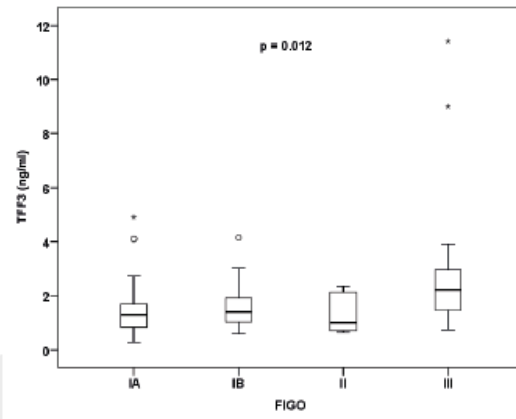


Figure 4: TFF3 serum levels in endometrial cancer stage IA (IA, n=46), stage IB (IB, n=23), stage II (II, n=12), and stage III (III, n=17) patients.

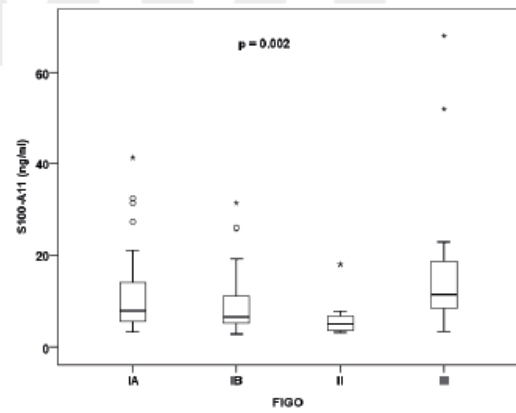


Figure 5: S100-A11 serum levels in endometrial cancer stage IA (IA, n=46), stage IB (IB, n=23), stage II (II, n=12), and stage III (III, n=17) patients.

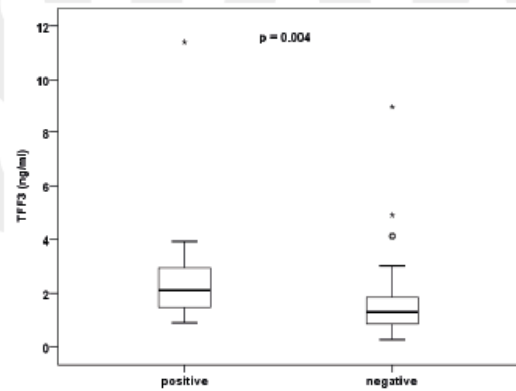


Figure 6: TFF3 serum levels in lymphonode positive (positive, n=14), and lymphonode negative (negative, n=84) endometrial cancer patients.

Table 2: Correlations between laboratory and clinical parameters at baseline in the control (C) group (n=24), BMI (body mass index), CRP (c-reactive protein), IL-6 (interleukin - 6), TFF3 (intestinal trefoil factor 3), AIF-1 (allograft inflammatory factor-1), S100-A11 (calgizzarin).

C (n = 24)	Age	BMI	Leuko-cytes-1	Platelets -1	CRP-1	IL-6-1	Citrulline -1	Vitamin D-1	Alpha-tocopherol -1	Retinol -1	Kynurenine -1	Urinary neopterin/creatinine ratio-1	Tryptophan -1	Kynurenine/Tryptophan ratio-1	TFF3 (ng/ml)	S100-A11 (ng/ml)	AIF-1 (pg/ml)
TFF3 (ng/ml)	Corr. 0.261	0.181	0.033	-0.171	0.086	-0.130	-0.354	0.209	-0.253	0.316	0.071	-0.198	-0.082	-0.016	1.000	0.247	0.088
	Sig.	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
S100-A11 (ng/ml)	Corr. -0.261	0.170	-0.159	-0.006	0.339	0.319	0.326	0.335	-0.022	0.085	0.258	-0.082	0.544	-0.132	0.247	1.000	0.874
	Sig.	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,0001
AIF-1 (pg/ml)	Corr. -0.366	0.286	-0.198	0.121	0.386	0.205	0.260	0.286	0.280	0.272	0.214	-0.099	0.445	-0.170	0.088	0.874	1.000
	Sig.	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.0001

NS: not significant.

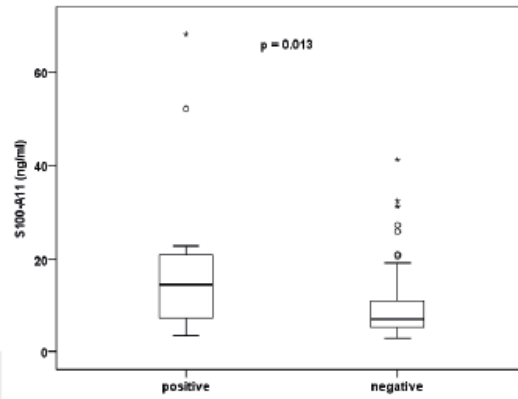


Figure 7: S100-A11 serum levels in lymph node positive (positive, n=14), and lymph node negative (negative, n=84) endometrial cancer patients.

vitamin D, kynurenine, urinary neopterin/creatinine ratio and kynurenine/tryptophan ratio. S100-A11, as well as AIF-1 correlated positively with IL-6 and TFF3. In controls (Tab 2), S100-A11 correlated positively with AIF-1 ($r_s=0.874$, $p=0.0001$).

Discussion

The present data demonstrate an increase of serum TFF3, S100-A11 and AIF-1 concentrations in patients with endometrial carcinoma compared to control groups with endometrial hyperplasia or normal endometrium. Moreover, the concentrations of TFF3 and S100-A11 were associated with tumor stage and lymph node status. These findings indicate that these molecules could serve as biomarkers in the diagnosis, pre-operative work up and possibly follow up of patients with endometrial cancer.

The determination of biomarkers is essential in the management of cancer patients [19]. In addition to identification of additional tumor biomarkers in endometrial cancer, present data provide further insight into the interaction between the tumor mass, immune and inflammatory responses. TFF3, S100-A11 and AIF-1 concentrations exhibited correlation with biomarkers of inflammatory response. Interestingly, a significant correlation with IL-6 was observed for all these three biomarkers, while only TFF3 correlated with urinary neopterin, serum kynurenine and kynurenine/tryptophan ratio, and none of the biomarkers correlated with CRP. These correlations may be explained by an association of inflammatory response with the tumor mass, in correspondence to the observed association between TFF3

and S100-A11 concentrations and tumor stage and lymph node status. Low vitamin D concentrations are predictive of poor prognosis in different primary tumors and an inverse association with TFF3 is not surprising.

Tumor growth and progression is associated with an inflammatory response. In fact, this inflammatory response promoting tumor progression is now considered to represent one of the hallmarks of cancer [20]. Macrophages may represent important effectors of antitumor response, but also contribute to tumor growth and progression [21, 22]. Neopterin is a product of activated macrophages. Although increased serum or urinary neopterin concentrations are encountered in different disorders leading to the stimulation of macrophages by interferon-gamma [23, 24], and neopterin as a biomarker is therefore non-specific, chronic macrophage stimulation leading to increased neopterin concentrations is characteristic of advanced tumors across the spectrum of different malignancies [25, 26]. Moreover, increased neopterin has been shown to be a negative prognostic biomarker in different tumors, including gynecological cancers [25, 26]. High neopterin concentrations have been associated with the presence of laboratory parameters of immune dysfunction both in the tumor microenvironment [27, 28] and in the circulation [29]. Kynurenine is produced from tryptophan in a reaction catalyzed by another enzyme induced by interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Although kynurenine, in high concentrations, has cytotoxic activity against tumor cells [30], and IDO induction has been implicated in the mechanism of antitumor activity of interferon-gamma [31], the predominant effect of tryptophan depletion and kynurenine itself is the suppression of the immune response [32]. Present data illustrate that higher tumor mass reflected in increased concentration of tumor biomarkers is associated with biomarkers of immune dysfunction like neopterin, kynurenine or kynurenine/tryptophan ratio.

In future studies, all these biomarkers should be investigated simultaneously to determine how therapeutic interventions are reflected in changing concentrations of these parameters. The studies should also include biomarkers of toxicity of systemic therapy, a largely neglected topic. With the exception of hematologic toxicity, other side effects of chemotherapy and radiation are assessed mostly by history or clinical examination while reliable laboratory biomarkers for monitoring and prediction of toxicity are still lacking [33-35]. Interestingly, in patients with rectal cancer an association between neopterin concentrations and complications of radiation

and chemotherapy, two methods also commonly used in endometrial cancer has been recently reported [36].

In conclusion, TFF3, S100-A11 and AIF-1 represent potential biomarkers in patients with endometrial cancer. TFF3 and S100-A11 increase with tumor stage and lymph node involvement, reflecting higher tumor mass that is also associated with increased concentration of biomarkers of immune dysfunction.

Acknowledgments: This project was supported by research grant IGA MH CR NT13566-4.

Conflict of interest: Authors state no conflict of interest.

References

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9-29.
2. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet.* 2005;366(9484):491-505.
3. Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer.* 1987;60(8 Suppl):2035-41.
4. Creasman W. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105(2):109.
5. Benedetti Panici P, Basile S, Maneschi F, Alberto Lissoni A, Signorelli M, Scambia G, et al. Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(23):1707-16.
6. Kyrgiou M, Kalliala I, Markozannes G, Gunter MJ, Paraskeva E, Gabra H, et al. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature. *BMJ.* 2017;356:j477.
7. Jorgensen KH, Thim L, Jacobsen HE. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept.* 1982;3(3-4):207-19.
8. Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(24):11017-21.
9. Thim L. A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett.* 1989;250(1):85-90.
10. Bignotti E, Ravaggi A, Tassi RA, Calza S, Rossi E, Falchetti M, et al. Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *Br J Cancer.* 2008;99(5):768-73.
11. Longman RJ, Thomas MG, Poulson R. Trefoil peptides and surgical disease. *Br J Surg.* 1999;86(6):740-8.

12. Kanamori T, Takakura K, Mandai M, Kariya M, Fukuhara K, Sakaguchi M, et al. Increased expression of calcium-binding protein S100 in human uterine smooth muscle tumours. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(10):735-42. [1]
13. Taverna D, Pollins AC, Sindona G, Caprioli RM, Nanney LB. Imaging mass spectrometry for assessing cutaneous wound healing: analysis of pressure ulcers. *J Proteome Res.* 2015;14(2):986-96. [2]
14. Deininger MH, Meyermann R, Schluesener HJ. The allograft inflammatory factor-1 family of proteins. *FEBS Lett.* 2002;514(2-3):115-21. [3]
15. Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest.* 1995;95(6):2954-62. [4]
16. Zhao YY, Yan DJ, Chen ZW. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. *Cell Immunol.* 2013;284(1-2):75-83. [5]
17. Zezulova M, Bartouskova M, Hlidkova E, Adam T, Kujovska Krcmova L, Cervinkova B, et al. Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(2):305-14. [6]
18. Pilka R, Marek R, Adam T, Kudela M, Ondrova D, Neubert D, et al. Systemic Inflammatory Response After Open, Laparoscopic and Robotic Surgery in Endometrial Cancer Patients. *Anticancer Res.* 2016;36(6):2909-22. [7]
19. Melichar B. Laboratory medicine and medical oncology: the tale of two Cinderellas. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51:99-112. [8]
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74. [9]
21. Melichar B, Freedman RS. Immunology of the peritoneal cavity: Relevance for host-tumor relation. *Int J Gynecol Cancer.* 2002;12:3-17. [10]
22. Freedman RS, Vadhan-Raj S, Butts C, Savary C, Melichar B, Verschraegen C, et al. Pilot study of Ft3 ligand comparing intraperitoneal with subcutaneous routes on hematologic and immunologic responses in patients with peritoneal carcinomatosis and mesotheliomas. *Clin Cancer Res.* 2003;9:5228-37. [11]
23. Melichar B, Gregor J, Solichova D, Lukes J, Tichy M, Pidman V. Increased urinary neopterin in acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry.* 1994;40:338-9. [12]
24. Solichova D, Melichar B, Blaha V, Klejna M, Vavrova J, Palicka V, et al. Biochemical profile and survival in nonagenarians. *Clin Biochem.* 2001;34:563-9. [13]
25. Melichar B, Solichova D, Freedman RS. Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16(1):240-52. [14]
26. Melichar B, Solichova D, Melicharova K, Malirova E, Cermanova M, Zadak Z. Urinary neopterin in patients with advanced colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers.* 2006;21(3):190-8. [15]
27. Melichar B, Jandik P, Krejsek J, Solichova D, Drahosova M, Skopec F, et al. Mitogen-induced lymphocyte proliferation and systemic immune activation in cancer patients. *Tumori.* 1996;82(3):218-20. [16]
28. Melichar B, Nash MA, Lenzi R, Platsoucas CD, Freedman RS. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3+ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clin Exp Immunol.* 2000;119(1):19-27. [17]
29. Melichar B, Touskova M, Solichova D, Kralickova P, Kopecky O. CD4+ T-lymphocytopenia and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumours. *Scand J Clin Lab Invest.* 2001;61:363-70. [18]
30. Melichar B, Ferrandina G, Verschraegen CF, Loercher A, Abbruzzese JL, Freedman RS. Growth inhibitory effects of aromatic fatty acids on ovarian tumor cell lines. *Clinical Cancer Research.* 1998;4:3069-76. [19]
31. Burke F, Knowles RG, East N, Balkwill FR. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gama *in vivo*. *International Journal of Cancer.* 1995;60:115 - 22. [20]
32. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, et al. Indoleamin 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *International Journal of Cancer.* 2002;101:151 - 5. [21]
33. Melichar B, Kohout P, Bratova M, Solichova D, Kralickova P, Zadak Z. Intestinal permeability in patients with chemotherapy-induced stomatitis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001;127(5):314-8. [22]
34. Melichar B, Nemcova I. Eye complications of cetuximab therapy. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2007;16(5):439-43. [23]
35. Poprach A, Pavlik T, Melichar B, Puzanov I, Dusek L, Bortlicek Z, et al. Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: a national registry-based study. *Ann Oncol.* 2012;23(12):3137-43. [24]
36. Zezulova M, Bartouskova M, Hlidkova E, Adam T, Kujovska Krcmova L, Cervinkova B, et al. Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54:305-14. [25]

PŘÍLOHA Č. 7

Publikace – původní vědecká publikace v recenzovaném časopise

Zvýšení hladin TFF3 u žen s karcinomem endometria

Elevated levels of TFF3 in endometrial cancer patients

Neubert D.¹, Ondrová D.¹, Hambálek J.¹, Maděrka M.¹, Sobková K.¹, Stejskal D.^{2,3}, Krejčí G.³, Pilka R.¹

¹Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP, Olomouc, přednosta prof. MUDr. R. Pilka, Ph.D.

²VIA Agel, ředitelka Mgr. Ing. K. Murtingerová

³Oddělení laboratorní medicíny Středomoravské nemocniční, Prostějov, přednosta prof. MUDr. D. Stejskal, Ph.D.

ABSTRACT

Aim: Trefoil peptides are a family of small proteins that are expressed in a site-specific fashion by certain epithelial tissues. These peptides might be used as markers for neoplastic uterine disease.

Design: Experimental study.

Setting: Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital, Medical Faculty, Palacký University, Olomouc; Department of Laboratory Biochemistry, Central Moravian Hospital Trust, Member of Agel holding, Prostějov.

Methods: During the time period from 2012 to 2015 eighty-nine women underwent hysteroscopy and endometrial biopsy for postmenopausal bleeding. Fifty three patients, at the age of (mean \pm standard deviation) 63,4 \pm 9,5 (33–80) years were diagnosed with endometrial cancer, six patients at the age of 62,9 \pm 6,4 (55–74)

years were diagnosed with endometrial hyperplasia and thirty patients at the age of 63,3 \pm 9,3 (48–62) years diagnosed with endometrial atrophy represented control group. At the day of surgery the venous blood was sampled and subsequently examined for the levels of TFF1, TFF2 and TFF3.

Results: TFF3 levels were significantly higher in patients with endometrial carcinoma but not in endometrial hyperplasia subgroup. The levels of TFF1 and TFF2 were not different in selected histopathological subgroups.

Conclusion: We have shown elevated levels of TFF3 but not of TFF1 and TFF2 in patients with endometrial cancer. TFF1, TFF2 and TFF3 levels were not elevated in patients with endometrial hyperplasia.

KEYWORDS

TFF, carcinoma, endometrial, trefoil factor, serous

SOUHRN

Cíl: Trefoil peptidy patří do skupiny malých peptidů, jejichž exprese je místně i tkáňově specifická. Tyto peptidy by mohly být využity jako markery nádorového onemocnění dělohy.

Typ studie: Experimentální studie.

Název a sídlo pracoviště: Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, Středomoravská nemocniční a.s., Nemocnice Prostějov.

Metodika: V období od 2012 do 2015 podstoupilo osmdesát devět žen hysteroskopii a biopsii endometria pro krvácení v postmenopauze. U padesáti tří pacientek ve věku (průměr \pm standardní odchylka) 63,4 \pm 9,5 (33–80) let byl diagnostikován karcinom endometria, u šesti pacientek ve věku 62,9 \pm 6,4 (55–74) let byla diagnostikována hyperplazie endometria a třicet pacientek ve věku 63,3 \pm 9,3 (48–62) let s histologicky verifikovanou

atrofií endometria tvořilo kontrolní soubor. V den výkonu byl každé pacientce odebrán vzorek venózní krve, který byl následně vyšetřen a byly stanoveny hladiny TFF1, TFF2 a TFF3.

Výsledky: Hladiny TFF3 byly významně vyšší u pacientek s karcinomem endometria, ale ne ve skupině žen s endometriální hyperplazií. Hladiny TFF1 a TFF2 se v jednotlivých histopatologických skupinách významně nelišily.

Závěr: Prokázali jsme zvýšené hladiny TFF3, ale ne TFF1 a TFF2 u pacientek s karcinomem endometria. U žen s endometriální hyperplazií nebyly hladiny TFF1, TFF2 a TFF3 zvýšeny.

KLÍČOVÁ SLOVA

TFF, karcinom, endometriální, trefoil faktor, sérový

Korespondující autor prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D., e-mail: radovan.pilka@fnol.cz
Čes. Gynek., 2018, 83, č. 2, s. xxx-xxx

Úvod

Endometriální karcinom je nejčastějším gynekologickým nádorem a jeho incidence se v České republice (ČR) pohybuje v posledním desetiletí mezi 33–37/100 000 žen/rok. Incidence tohoto nádoru patří v ČR k nejvyšším na světě a v absolutním vyjádření odpovídá 1740 až 1890 nově diagnostikovaných onemocnění za rok [20]. Hlavní diagnosticko-terapeutickou modalitou při managementu tohoto onemocnění je chirurgický staging s vyšetřením pánevních a paraaortálních lymfatických uzlin, neboť žádná z dostupných obrazových metod není natolik přesná, aby s jistotou vyloučila jejich metastatické postižení [32]. Takto radikální chirurgický management s sebou nese významnou operační zátěž a nemalé riziko peroperačních a pooperačních komplikací [37]. Ke snížení tohoto rizika by mohla přispět stratifikace pacientek do low-risk a high-risk skupin na podkladě klinických parametrů a molekulárních markerů [19].

Trefoil peptidy (trifoláty) patří do skupiny malých peptidů bohatých na cystein. Byly pojmenovány „trefoil“ peptidy Thimem v roce 1989 [34]. Dosud byly identifikovány tři savčí trefoil peptidy. TFF1 byl objeven v roce 1982 při pátrání po estrogeny indukované mRNA v buněčných liniích karcinomu prsu a ve stejném roce byl objeven spazmolytický peptid (TFF2) při izolaci prasečího inzulínu [13, 15]. Střevní trifolát TFF3 byl původně objeven v roce 1991 u krysu [33]. Ve snaze o standardizaci nomenklatury jsou tyto trefoil faktory dnes souhrnně nazývány rodina trifolátových peptidů (TFF). Jednotlivé trifolátové peptidy se tkáňově specificky vyskytují v epiteliálních buňkách lidského gastrointestinálního ústrojí: TFF1 v epiteliálních povrchových foveolárních buňkách celého žaludku, TFF2 v distální části žaludku a v dolních částech Brunnerových žlázek duodena a TFF3 v průběhu celé délky tenkého i tlustého střeva [7, 8, 25, 29, 35]. Jedná se o velmi stabilní molekuly, rezistentní k účinkům kyselin, proteáz i tepelné degradaci [13, 24].

Jejich fyziologický výskyt byl již dokumentován i v dalších tkáních – hypofýze, hypotalamu, slinných žlázách, v děloze a prsní tkáni [9, 23, 27, 28]. U mladých žen se vzorec exprese mění v závislosti na menstruačním cyklu. Produkce TFF3 byla kromě jiných epiteliálních povrchů prokázána i v děložním endometriu [3, 14].

TFF1 byl původně izolován z buněk karcinomu prsu. Od té doby několik studií dokumentovalo vztah mezi TFF peptidy a vznikem neoplazií. Exprese TFF1 byla prokázána u mnoha známých epiteliálních karcinomů, včetně karcinomu prsu, žaludku, slinivky, plic, endometria, vaječníku (zejména mucinózní typ), prostaty a dále některé

nádory močového měchýře a děložního čípku [2, 10]. U karcinomu prsu, kde je exprese TFF1 přítomna až u 50 % nádorů, je pozitivita na TFF1 spojena se stavem estrogenových receptorů, odpovědí na hormonální léčbu a příznivou prognózu [4, 5]. U všech ostatních tumorů se zdá být přítomnost TFF1 nezávislá na stavu estrogenových receptorů. V nedávných studiích byly prokázány vyšší sérové hladiny TFF3 u pacientek s endometriálním karcinomem G3 ve srovnání se zdravými kontrolami [21]. Podobně imunohistochemické analýzy ukázaly zvýšenou expresi TFF3 u špatně diferencovaných endometriálních karcinomů [18]. Tyto výsledky ukazují, že trifoláty by v budoucnu mohly sloužit jako sérové markery nádorových a inflamatorních onemocnění. V naší práci jsme se zaměřili na hodnoty sérových hladin TFF1 a TFF2 u pacientek a karcinomem endometria ve srovnání se zdravými kontrolami a pacientkami s hyperplastickým endometriem, které v dostupné literatuře nebyly dosud publikovány.

METODIKA

Soubor pacientek

Tato prospektivní studie byla provedena na Porodnicko-gynekologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci v období říjen 2012 a červen 2015. Studie byla schválena etickou komisí a všechny pacientky potvrdily svou účast ve studii podpisem informovaného souhlasu. Do studované skupiny bylo zařazeno konsektivně osmdesát devět pacientek, které podstoupily hysteroskopii a izolovanou kyretáž pro postmenopauzální krvácení. U padesáti tří pacientek ve věku (průměr ± standardní odchylka) 63,4 ± 9,5 (33–80) let byl histopatologicky z materiálu získaného při kyretáži diagnostikován karcinom endometria, u šesti pacientek ve věku 62,9 ± 6,4 (55–74) let byla diagnostikována hyperplazie endometria a třicet pacientek ve věku 63,3 ± 9,3 (48–62) let s histologicky verifikovanou atrofií endometria tvořilo kontrolní soubor. Před operačním výkonem byla každé pacientce odebrána venózní krev a odeslána byla na laboratorní vyšetření TFF1, TFF2 a TFF3.

Příprava vzorku

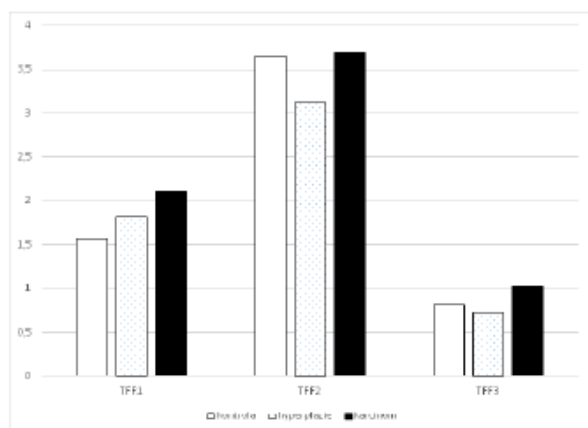
Protokol byl schválen etickou komisí. Vzorky venózní krve byly získány po 12 hodinách na lačno a byly poté centrifugovány (1600×g, 10 min, +4 °C) s následnou separací séra. Poté bylo 200 µl séra rozředěno se 100 µl fosfátového pufru (15 mmol/L, pH 6.5) a deproteinizováno pomocí 100 µL chlazeného etanolu (10 min, -25 °C). Po centrifugaci (14,000×g, 10 min), byl supernatant filtrován za použití 0,2 µm mikrotitračních filtrů a vakuován. Filtrovaný roztok byl poté vložen do HPLC sloupce.

Vyšetření TFF1, TFF2 a TFF3

Způsoby vyšetření TFF1, TFF2 a TFF3 byly vyvinuty firmou Biovendor (Czech Republic, Brno). Všechny parametry byly měřeny při dostatečných analytických charakteristikách; CV < 5 %, CV mezi jednotlivými sériemi < 8 %; a měření analytických charakteristik bylo dokonalejší než bylo uvedeno v laboratorním manuálu. Všechna měření byla provedena ve stejném časovém období, na birobotickém analyzátoru DS2 (Dynex, USA), po centrifugaci (aliquotní sérum, chlazená centrifuga, 4 C, 3500/4 min, zmražený).

VÝSLEDKY

Z hlediska věku se nelišily pacientky ve skupině s karcinomem, s endometriální hyperplazií a v kontrolní skupině. Sérové hladiny TFF1 byly ve skupině s karcinomem endometria na úrovni (průměr ± standardní odchylka) $3,04 \pm 3,55$ ng/ml (0,48–20,97), ve skupině s hyperplazií endometria byly $2,15 \pm 1,14$ ng/ml (0,96–4,14) a ve skupině kontrolní $2,47 \pm 2,23$ ng/ml (0,51–9,52). V sérových hodnotách TFF1 nebyl mezi skupinami statisticky významný rozdíl. Sérové hladiny TFF2 byly ve skupině s karcinomem endometria na úrovni $5,22 \pm 4,74$ ng/ml (1,06–25,94), ve skupině s hyperplazií endometria byly zjištěny hodnoty $3,19 \pm 1,19$ ng/ml (1,93–5,14) a ve skupině kontrolní se hodnoty pohybovaly na úrovních $4,2 \pm 2,19$ ng/ml (0,89–11,33). V sérových hodnotách TFF2 nebyl mezi jednotlivými skupinami zjištěn statisticky významný rozdíl (graf 1, tab .1). Sérové hladiny TFF3 byly ve skupině s karcinomem endometria na úrovni $1,72 \pm 1,52$ ng/ml (0,27–11,41), ve skupině s hyperplazií endometria byly hladiny na úrovni $1,27 \pm 0,58$ ng/ml (0,49–2,93) a ve skupině kontrolní byly zjištěny hodnoty $1,54 \pm 2,04$ ng/



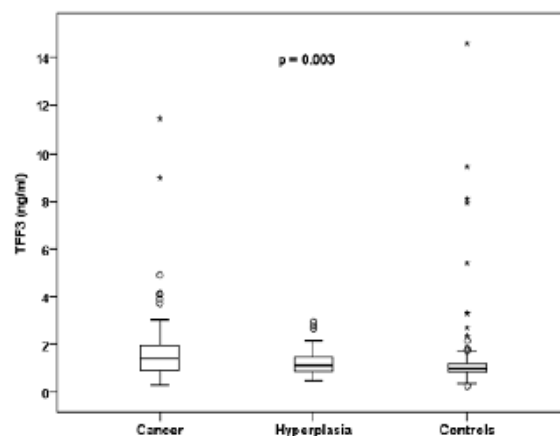
Graf 1 Porovnání sérových hladin TFF1, TFF2 a TFF3 u pacientek s karcinomem endometria (n = 53), endometriální hyperplazií (n = 6) a benigním nálezem na endometriu (kontrola; n = 30)

ml (0,26–14,56). Hodnoty TFF3 byly ve skupině pacientek s karcinomem endometria významně vyšší než u pacientek s endometriální hyperplazií a ve skupině kontrolní (graf 2, tab. 1).

DISKUSE

Nové molekulární přístupy ve výzkumu nádorů umožnily v poslední době identifikovat nové onkogeny/tumor supresorové geny, které by mohly hrát roli při rozvoji a progresi endometriálního karcinomu. Fyziologicky jsou trifoláty exprimovány v epitelu gastrointestinálního traktu, a to orgánově specificky. TFF1 je přítomen rovnoměrně ve sliznici žaludku, TFF2 ve sliznici distálního žaludku a duodena a TFF3 ve sliznici tenkého a tlustého střeva [7, 8, 29, 33, 35]. Tato orgánově specifická exprese bývá narušena při ulcerativních a inflamatorních onemocněních, kdy dochází ke zvýšené expresi TFF3 v místě žaludečního vředu [9]. Do současné doby bylo publikováno velmi málo údajů týkajících se významu a funkce trifolátů u karcinomu endometria.

Zvýšená exprese TFF1 byla nalezena u karcinomu prsu, žaludku, pankreatu, plic, endometria, ovaria, prostaty a děložního hrdla [2, 10]. U karcinomu prsu byla exprese TFF1 přítomna v 50 % tumorů a je signifikantně asociovaná se stavem estrogenových receptorů, citlivostí na hormonální léčbu a s příznivou prognózou [4, 5, 22]. Ve všech ostatních nádorech byla však exprese TFF1 nezávislá na stavu estrogenních receptorů. Zvýšené sérové hladiny TFF1 korelovaly s pokročilostí bronchiálního adenokarcinomu, a zejména specificky gobletového podtypu bronchoalveolárního karcinomu. Současně byly TFF1 pozitivní adenokarcinomy asociovány s horší prognózou než tumory negativní [11]. V naší práci



Graf 2 Porovnání sérových hladin TFF3 u pacientek s karcinomem endometria (cancer; n = 53), endometriální hyperplazií (hyperplasia; n = 6) a benigním nálezem na endometriu (controls; n = 30)

Tab. 1 Statistické vyhodnocení sérových hladin TFF1, TFF2, TFF3 u pacientek s karcinomem endometria (cancer), endometriální hyperplazií (hyperplasia) a benigním nálezem na endometriu (controls)

	Cancer (n = 53)					Hyperplasia (n = 6)					Controls (n = 30)					p
	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD	Med	Min	Max	Mean	SD	Med	Min	Max	
Věk	63,4	9,5	64	33	80	62,9	6,4	64	55	74	63,3	9,3	62	48	85	0,991a
TFF1 (ng/ml)	3,04	3,55	2,11	0,48	20,97	2,15	1,14	1,83	0,96	4,14	2,47	2,23	1,57	0,51	9,52	0,726b
TFF2 (ng/ml)	5,22	4,74	3,69	1,06	25,94	3,19	1,19	3,12	1,93	5,14	4,20	2,19	3,65	0,89	11,33	0,518b
TFF3 (ng/ml)	1,72	1,52	1,40	0,27	11,41	1,27	0,58	1,13	0,49	2,93	1,54	2,04	0,97	0,26	14,56	0,003b

*ANOVA, *Kruskalův-Wallisův test

jsme neprokázali zvýšené sérové hladiny TFF1 u pacientek s karcinomem endometria ve srovnání s pacientkami s endometriální hyperplazií nebo normálním endometriem.

TFF2 má velmi krátký biologický poločas a je volně vylučován ledvinami [26]. Jeho koncentrace v žaludeční šťávě vykazují velmi silnou diurnální variabilitu a dosahují nejvyšších hodnot v noci, zatímco v průběhu digestce se jeho hladina silně snižuje [31]. Vymizení TFF2 u geneticky programovaného myšního modelu karcinomu žaludku má za následek zvýšenou proliferaci a větší nádory [6] TFF2 vykazuje tumor-suppresorovou aktivitu v myším pankreatu a brání formaci mucinózních nádorů [38]. Ishibashi et al. našli recentně zvýšené sérové hladiny TFF1 a TFF3 u pacientek s karcinomem prsu, zatímco hladiny TFF2 byly vyšší u zdravých kontrol. Autoři tento rozdíl vysvětlují možným vlivem hladin TFF1 a TFF3 na hladinu TFF2 [12]. V naší práci jsme našli dvakrát vyšší sérové hladiny TFF2 ve všech sledovaných skupinách, než byly hladiny TFF1 a TFF3. Rozdíly mezi hladinami TFF2 u pacientek s endometriálním karcinomem, endometriální hyperplazií a normálním endometriem nebyly statisticky signifikantní.

Z dostupných publikací byla zvýšená exprese TFF3 na úrovni genu a RNA prokázána u endometriálního karcinomu ve srovnání s karcinomem serózním a stejně tak u nízké diferencovaného endometriálního karcinomu ve srovnání s normálním endometriem [16, 18, 30]. Bignotti et al. našli zvýšenou imunoexpresi proteinu TFF3 u 79 % nízké diferencovaných karcinomů endometria a u 18 % vzorků normální děložní sliznice [1]. Původ cirkulujících hladin TFF3 není zcela zřejmý, i když TFF3 je exprimováno ve tkáních ženského genitálu a in vitro studie prokázaly, že stejně jako u TFF1 i exprese TFF3 je regulována estrogenem [17]. Chybění fluktuací sérových hladin TFF3 v průběhu menstruačního

cyklu však ukazuje, že cirkulující TFF3 pochází převážně z tkání, které nejsou pod vlivem estrogenu [36].

V naší práci jsme našli významně zvýšené sérové hladiny TFF3 ve srovnání s hladinami u pacientek s endometriální hyperplazií a benigním histopatologickým nálezem.

ZÁVĚR

Prokázali jsme zvýšené hladiny TFF3, ale ne TFF1 a TFF2 u pacientek s onemocněním karcinomu endometria. Z výsledků naší studie je zřejmé, že TFF3 by mohl hrát roli jako marker onemocnění u pacientek s karcinomem endometria. Další studie jsou nutné pro detailnější objasnění jeho biologické role při rozvoji tohoto onemocnění.

LITERATURA

1. Bignotti, E., Ravaggi, A., Tassi, RA., et al. Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *Br J Cancer* 2008, 99(5), p. 768–773.
2. Bonkhoff, H., Stein, U., Welter, C., et al. Differential expression of the pS2 protein in the human prostate and prostate cancer: association with premalignant changes and neuroendocrine differentiation. *Hum Pathol*, 1995, 26(8), p. 824–828.
3. Borthwick, JM., Charnock-Jones, DS., Tom, BD., et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2003, 9(1), p. 19–33.
4. Cappelletti, V., Coradini, D., Scanziani, E., et al. Prognostic relevance of pS2 status in association with steroid receptor status and proliferative activity in node-negative breast cancer. *Eur J Cancer*, 1992, 28A(8–9), p. 1315–1318.
5. Foekens, JA., Rio, MC., Seguin, P., et al. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res*, 1990, 50(13), p. 3832–3827.

6. Fox, JG., Rogers, AB., Whary, MT., et al. Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 -/- C57BL6 x Sv129 Helicobacter pylori-infected mice. *Am J Pathol*, 2007, 171(5), p. 1520-1528.
7. Hanby, AM., Poulson, R., Elia, G., et al. The expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in 'gastric metaplasia' of the proximal duodenum: implications for the nature of 'gastric metaplasia'. *J Pathol*, 1993, 169(3), p. 355-360.
8. Hanby, AM., Poulson, R., Singh, S., et al. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology*, 1993, 105(4), p. 1110-1116.
9. Hauser, F., Poulson, R., Chinery, R., et al. hP1.B, a human P-domain peptide homologous with rat intestinal trefoil factor, is expressed also in the ulcer-associated cell lineage and the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(15), p. 6961-6965.
10. Henry, JA., Bennett, MK., Piggott, NH., et al. Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours. *Br J Cancer*, 1991, 64(4), p. 677-682.
11. Higashiyama, M., Doi, O., Kodama, K., et al. Estimation of serum level of pS2 protein in patients with lung adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 1996, 16(4B), p. 2351-2355.
12. Ishibashi, Y., Ohtsu, H., Ikenura, M., et al. Serum TFF1 and TFF3 but not TFF2 are higher in women with breast cancer than in women without breast cancer. *Sci Rep*, 2017, 7(1), p. 4846.
13. Jorgensen, KH., Thim, L., Jacobsen, HE. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept*, 1982, 3(3-4), p. 207-219.
14. Kao, LC., Tulac, S., Lobo, S., et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 2002, 143(6), p. 2119-2138.
15. Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., et al. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982, 10(24), p. 7895-7903.
16. Maxwell, GL., Chandramouli, GV., Dainty, L., et al. Microarray analysis of endometrial carcinomas and mixed Mullerian tumors reveals distinct gene expression profiles associated with different histologic types of uterine cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11), p. 4056-4066.
17. May, FE., Westley, BR. Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J Pathol*, 1997, 182(4), p. 404-413.
18. Mhawech, P., Benz, A., Cerato, C., et al. Downregulation of 14-3-3 sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. *Mod Pathol*, 2005, 18(3), p. 340-348.
19. Mickova, I., Pilka, R., L'ubusky, M., et al. [Molecular prognostic factors and pathogenesis of endometrial cancer]. *Ces Gynekol*, 2006, 71(4), p. 355-360.
20. Mika, O., Koznarova, J., Sak, P. [Ultrasound staging of stage I-II endometrial cancer, analysis of own file in the years 2012-2016]. *Ces Gynekol*, 2017, 82(3), p. 218-226.
21. Neubert, D., Pilka, R., Stejskal, D., et al. [The role of trefoil factor family in gynecological disease]. *Ces Gynekol*, 81(6), p. 444-450.
22. Pallud, C., Le Doussal, V., Pichon, MF., et al. Immunohistochemistry of pS2 in normal human breast and in various histological forms of breast tumours. *Histopathology*, 1993, 23(3), p. 249-256.
23. Piggott, NH., Henry, JA., May, FE., et al. Antipeptide antibodies against the pNR-2 oestrogen-regulated protein of human breast cancer cells and detection of pNR-2 expression in normal tissues by immunohistochemistry. *J Pathol*, 1991, 163(2), p. 95-104.
24. Playford, RJ., Marchbank, T., Chinery, R., et al. Human spasmolytic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology*, 1995, 108(1), p. 108-116.
25. Podolsky, DK., Lynch-Devaney, K., Stow, JL., et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem*, 1993, 268(9), p. 6694-6702.
26. Poulsen, SS., Thulesen, J., Christensen, L., et al. 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*, 1999, 45(4), p. 516-522.
27. Poulson, R., Hanby, AM., Lalani, EN., et al. Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J Pathol*, 1997, 183(1), p. 30-38.
28. Probst, JC., Zetzsche, T., Weber, M., et al. Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide. *FASEB J*, 1996, 10(13), p. 1518-1523.
29. Rio, MC., Bellocq, JP., Daniel, JY., et al. Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science*, 1988, 241(4866), p. 705-708.
30. Risinger, JI., Maxwell, GL., Chandramouli, GV., et al. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res* 2003, 63(1), p. 6-11.
31. Semple, JI., Newton, JL., Westley, BR., et al. Dramatic diurnal variation in the concentration of the human trefoil peptide TFF2 in gastric juice. *Gut*, 2001, 48(5), p. 648-655.
32. Slama, J., Kocian, R. [Technique of pelvic and paraaortic lymphadenectomy]. *Ces Gynekol*, 81(4), p. 253-264.
33. Suemori, S., Lynch-Devaney, K., Podolsky, DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(24), p. 11017-11021.
34. Thim, L. A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett*, 1989, 250(1), p. 85-90.
35. Tomasetto, C., Rio, MC., Gautier, C., et al. hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J*, 1990, 9(2), p. 407-414.
36. Vestergaard, EM., Poulsen, SS., Gronbaek, H., et al. Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3. *Clin Chem*, 2002, 48(10), p. 1689-1695.
37. Weinberger, V., Minar, L., Felsing, M., et al. [Postoperative administration of octreotide to reduce lymphorrhea, lymphocele,

lymphedema and lymphatic ascites after lymphadenectomy in gynecological malignancies]. Ces Gynekol, 2017, 82(2), p. 92–99.

38. Yamaguchi, J., Mino-Kenudson, M., Liss, AS., et al. loss of trefoil factor 2 from pancreatic duct glands promotes formation of intraductal papillary mucinous neoplasms in mice. Gastroenterology 2016, 151(6), p. 1232–1244 e10.

Korespondující autor
Prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D.
Porodnicko-gynekologická klinika
FN a LF UP
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: radovan.pilka@fnol.cz

