

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-
TECHNOLOGICKÁ

OPTIMALIZACE PODMÍNEK
IMUNOMAGNETICKÉ SEPARACE
PRO ZÁCHYT KALRETIKULINU,
BIOMARKERU ZÁNĚTU,
VE VZORCÍCH PLODOVÉ VODY
DIPLOMOVÁ PRÁCE

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Tereza Veselá
Osobní číslo:	C19555
Studijní program:	N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví
Téma práce:	Optimalizace podmínek imunomagnetické separace pro záchyt kalretikulinu, biomarkeru zánětu, ve vzorcích plodové vody
Téma práce anglicky:	Optimization Of Immunomagnetic Separation Process To Capture Calreticulin, Biomarker Of Inflammation, In Amniotic Fluid Samples
Zadávací katedra:	Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- 1) popis komplikací v případě předčasného odtoku plodové vody u těhotných, zaměřit se na rizika vzniku zánětu vedoucího v některých případech k sepsi a/nebo předčasnému porodu
- 2) přehled významných biomarkerů zánětu, jejichž hladina v plodové vodě může stoupat (klesat) a mohou se tak stát indikátory počínajícího zánětu s důrazem na kalretikulín. Popis rozvoje infekčního zánětu a jaké složky imunitního systému se do tohoto procesu zapojují.
- 3) popis principu imunomagnetické separace – princip biofunkcionalizace magnetických částic ze zaměřením na různé způsoby vazby ligandů, tj. IgG molekul, na pevnou fázi. Popis možností, jak vázat IgG kovalentní vazbou, porovnání výhod a nevýhod těchto postupů, skladování a stabilita imunosorbentů. Popis podmínek, za kterých probíhá izolace cílových struktur pomocí těchto imunosorbentů.

Experimentální část:

- 1) Vytipování nejvhodnějších specifických protilátek pro přípravu imunosorbentu – základní metody pro charakterizaci proteinů – stanovení molekulové hmotnosti, ověření čistoty – elektroforetická separace proteinů (SDS-PAGE), blotovací techniky (western-blot, dot-blot) pro ověření reaktivity specifických antigenů a protilátek – vytipování reaktivního páru antigen – protilátka
- 2) příprava imunosorbentů – imobilizace IgG protilátek na magnetické částice s -COOH sk., hydrazidové sk., pomocí proteinu A/G. Vytipování vhodného způsobu imobilizace specifických anti-CALR protilátek. Ověření účinnosti imobilizace pomocí SDS-PAGE, denzitometrické vyhodnocení. Porovnání účinnosti jednotlivých způsobů vazby a testovaných magnetických nosičů.
- 3) ověření reaktivity připravených nosičů s cílovým antigenem – účinnost záchytu a eluce antigenu – ověření metodou SDS-PAGE či dot-blot.
- 4) pro nejúčinnější imunosorbent ověřit schopnost záchytu (specifitu a selektivitu) v komplexní biologické matici – plodová voda.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy. Další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

LS.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

Bc. Tereza Veselá

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí m diplomové práce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za pomoc, cenné rady, profesionální vedení a připomínky, které mi poskytovala po celou dobu zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři a odborné rady, jež mi vždy ráda poskytla. Poděkování patří i mé rodině a mým blízkým za trpělivost a podporu při psaní mé diplomové práce.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zaměřuje na optimalizaci podmínek imunomagnetické separace pro záchyt kalretikulinu ve vzorcích plodové vody. Kalretikulin je biomarker asociovaný s rizikem vzniku intrauterinního zánětu, který může způsobit předčasný odtok plodové vody a následně předčasný porod. Úkolem diplomové práce bylo připravit imunosorbent na bázi superparamagnetických mikročástic, na které se budou kovalentně vázat molekuly IgG a specifického anti-CLR. Tento imunosorbent byl poté použit pro záchyt proteinu kalretikulinu, biomarkeru zánětu, v plodové vodě. Tímto byla ověřena kvalita imunosorbentu, jenž bude součástí senzoru pro simultánní analýzu biomarkerů zánětu v plodové vodě.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kalretikulin, biomarker, předčasný odtok plodové vody, imunomagnetická separace, anti-CLR protilátky, superparamagnetické mikročástice

TITLE

Optimization of immunomagnetic separation process to capture Calreticulin, biomarker of inflammation, in amniotic fluid samples.

ANNOTATION

This diploma thesis focuses on the optimization of immunomagnetic separation conditions for the capture of calreticulin in amniotic fluid samples. Calreticulin is a biomarker associated with the risk of intrauterine inflammation, which can cause premature amniotic fluid outflow and subsequent preterm labor. The task of the diploma thesis was to prepare an immunosorbent based on superparamagnetic microparticles, to which IgG molecules and specific anti-CLR will covalently bind. This immunosorbent was then used to capture kalreticulin protein, a biomarker of inflammation, in amniotic fluid. This verified the quality of the immunosorbent, which will be part of the sensor for simultaneous analysis of inflammatory biomarkers in amniotic fluid.

KEYWORD

Calretikulin, biomarker, premature amniotic fluid outflow, immunomagnetic separation, anti-CLR antibodies, superparamagnetic microparticles

Obsah

ÚVOD	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	19
1.1 Plodová voda.....	19
1.1.1 Fyziologie a funkce plodové vody.....	19
1.1.2 Složení plodové vody	21
1.1.3 Odběr plodové vody	24
1.2 Plodová voda a patologické stavy v těhotenství	27
1.2.1 Oligohydramnion a polyhydramnion.....	27
1.2.3 Preeklampsie.....	29
1.2.4 Syndrom aspirace mekonia.....	32
1.2.5 Předčasný porod.....	37
1.2.6 Předčasný odtok plodové vody	45
1.3 Biomarkery intrauterinního zánětu	50
1.3.1 Průkaz biomarkerů.....	52
1.3.2 Význam biomarkerů v managementu předčasného porodu.....	54
1.3.3 Přehled nejvýznamnějších biomarkerů předčasného porodu	54
1.4 Kalretikulin.....	60
1.4.1 Výskyt kalretikulinu	61
1.4.2 Struktura kalretikulinu	62
1.4.3 Význam a funkce kalretikulinu.....	63
1.4.4 Kalretikulin a jeho význam v autoimunitě.....	66
1.4.5 Význam kalretikulinu u předčasného odtoku plodové vody	66
1.4.6 Kalretikulin a jeho význam v preeklampsii	68
1.5 Imunomagnetická separace	69
1.5.1 Princip imunomagnetické separace	70
1.5.2 Biofunkcionalizace povrchu magnetických částic.....	71

1.5.3	Možnosti imobilizace ligandů	73
1.5.4	Imunosorbenty	76
1.5.5	Způsoby provedení imunomagnetické separace	77
2	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	79
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	80
3.1	Laboratorní přístroje a pomůcky	80
3.2	Seznam použitých chemikálií	81
3.3	Použité protilátky a antigeny.....	82
3.4	Typy použitých nosičů	83
3.5	Příprava použitých roztoků	83
3.6	Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	89
3.6.1	Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue	91
3.6.2	Barvení gelu roztokem amoniakálního stříbra.....	91
3.7	Oxidace IgG molekul a vazba IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou	92
3.8	Vazba IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou a s přidáním Sulfo-NHS.....	93
3.9	Vazba IgG molekul na magnetické částice modifikované Proteinem A, jejich stabilizace pomocí Sulfo-NHS	94
3.10	Oxidace IgG protilátek pomocí jodistanu sodného a jejich biotinylace pomocí Hydrazid-biotinu	94
3.11	Vazba biotinylovaných IgG molekul na magnetické částice modifikované Streptavidinem	96
3.12	Dot-blot analýza	96
3.13	Vazba anti-CALR IgG molekul na nosič s agarózou a Proteinem A.....	98
3.14	Vazba anti-CALR IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou a s přidáním Sulfo-NHS	99

3.15	Ověření funkčnosti připraveného imunosorbentu s imobilizovanými anti-CALR IgG pomocí imunokomplexu.....	99
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	101
4.1	Příprava imunosorbentu se 4 různými typy nosičů	101
4.1.1	Vazba IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou.....	102
4.1.2	Vazba IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou.....	104
4.1.3	Vazba IgG molekul na magnetické částice s modifikovaným Proteinem A	106
4.1.4	Vazba IgG molekul na magnetické částice modifikované Streptavidinem	108
4.2	Vyhodnocení nejlepší vazby IgG molekul na různé typy nosičů.....	111
4.3	Dot-blot analýza	112
4.4	Příprava imunosorbentu pro záchyt biomarkeru zánětu kalretikulinu	114
4.4.1	Vazba specifických anti-CALR IgG molekul na nosič s agarózou a s Proteinem A.....	114
4.4.2	Vazba specifických anti-CALR IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou.....	117
4.5	Ověření funkčnosti imunosorbentu	119
	ZÁVĚR	121
	POUŽITÁ LITERATURA.....	122

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma plodu obklopeného v plodových obalech v břišní dutině matky	19
Obrázek 2: Odběr plodové vody.....	25
Obrázek 3: Aktivace komplementu a inhibice zánětu přes molekuly C3 a C5 a pomocí Toll-like receptoru.....	36
Obrázek 4: Teoretická ROC křivka s tzv. AUC, definující diagnostickou přesnost, která se zlepšuje ve směru od křivky C ke křivce A	52
Obrázek 5: Pleotropní účinek interleukinu 6.....	55
Obrázek 6: AmniSure® ROM test pro prokázání přítomnosti PAMG-1	58
Obrázek 7: Struktura pentraxinu 3.....	59
Obrázek 8: 3D model N- a P- domény kalretikulinu.....	62
Obrázek 9: Imunomagnetická separace látek	71
Obrázek 10: Obecný postup magnetické separace při přípravě vzorku pro biologickou analýzu	72
Obrázek 11: Schéma nanášení vzorků do jamek	97
Obrázek 12: Schéma orientované imobilizace ligandů přes karbohydráty na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou	102
Obrázek 13: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby modelových IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou	103
Obrázek 14: Aktivace magnetických částic pomocí EDAC a Sulfo-NHS	104
Obrázek 15: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby modelových IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou.....	105
Obrázek 16: Schéma konjugace protilátky zajištěné Proteinem A nebo G	106
Obrázek 17: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby modelových IgG molekul na magnetické částice modifikované Proteinem A	107
Obrázek 18: Schéma biotinalyzy oxidované IgG protilátky pomocí Hydrazid-biotin	109
Obrázek 19: Schéma vazby biotinylovaných IgG molekuly na Streptavidin.....	109
Obrázek 20: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby modelových IgG molekul na magnetické částice modifikované Streptavidinem.....	110

Obrázek 21: Výsledek Dot-blot analýzy, testování vybraných protilátek anti-CALR IgG s rekombinantním proteinem CALR.....	113
Obrázek 22: Výsledek Dot-blot analýzy, testování vybraných protilátek anti-CALR IgG s rekombinantním proteinem CALR.....	113
Obrázek 23: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby anti-CALR IgG molekul (klon 9B4) na nosič s Proteinem A	115
Obrázek 24: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby anti-CALR IgG molekul (klon 9B4) na nosič s Proteinem A	116
Obrázek 25: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby anti-CALR IgG molekul (klon 5.1) na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou	118
Obrázek 26: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby a eluce antigenu kalretikulinu na/z imunosorbent/u (PBS pufr pH 7,4)	119

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE.....	90
Tabulka 2: Přehled použitých nosičů a přehled vazeb modelových hIgG protilátek	112
Tabulka 3: Přehled síly vazby protilátek k Proteinu A.....	117

Seznam zkratek

AChE	acetylcholinesteráza
AFP	α -fetoprotein
AMK	aminokyseliny
Anti-CALR	protilátky proti kalretikulinu
AUC	plocha pod křivkou (z angl. „Area Under Curve“)
C1q	produkovaný komplementový faktor 1q
CALR	kalretikulin
CD40/CD40L	diferenční antigen 40/ligand (z angl. „Cluster of Differentiation“)
CRP	C-reaktivní protein
CRP55	retikuloplazmin vázající Ca^{2+} ionty
CT	prahová hodnota cyklu (z angl. „Cycle Threshold“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. „Deoxyribonucleic Acid“)
EDAC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] karbodiimid
EGF	epidermální růstový faktor (z angl. „Epidermal growth Gactor“)
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (z angl. „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“)
EOP	časná preeklampsie (z angl. „Early Onset Preeclampsia“)
EPO	erytropoetin
ER	endoplazmatické retikulum
FIRS	systemové zánětlivé onemocnění plodu (z angl. „Fetal Inflammatory Response Syndrome“)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (z angl. „Fluorescent in Situ Hybridisation“)
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (z angl. „Granulocyte Colony Stimulating Factor“)
GGT	γ -glutamyltransferáza
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (z angl. „Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor“)
HNP1-3	lidský neutrofilní defensin (z angl. „Human Neutrophil Defensins“)

HSPs	protein teplotního šoku (z angl. „Heat Shock Proteins“)
HSP70	protein teplotního šoku 70 (z angl. „Heat Shock Protein 70“)
IAC	imunoafinitní chromatografie
IAI	intraamniotická infekce
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor 1 (z angl. „Insulin-like Growth Factor 1“)
IgG	imunoglobulin G
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IL-10	interleukin 10
IMS	imunomagnetická separace
INF γ	interferon gama
IS	imunitní systém
KDEL	retenční signál pro endoplazmatické retikulum (odvozen od 4 AMK lysin (K), aspartát (D), glutamát (E) a leucin (L))
LOP	pozdní preeklampsie (z angl. „Late-Onset Preeclampsia“)
MALDI-TOF-MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (z angl. „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-time of Flight-Mass Spectrometry“)
MAS	syndrom aspirace mekonie (z angl. „Meconium Aspiration Syndrome“)
M-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů (z angl. „Macrophage Colony-Stimulating Factor“)
MHC I	histokompatibilní komplex I (z angl. „Major Histocompatibility Complex“)
MIAC	mikrobiální invaze do amniální dutiny
MNP	magnetické částice (z angl. „Magnetic Nanoparticles“)
MSAF	amniotická tekutina zbarvená mekoniem (z angl. „Meconium-Stained Amniotic Fluid“)

PAF	trombocyty aktivující faktor (z angl. „Platelet-Activating Factor“)
PAMG-1	placentární α -mikroglobulin-1
PAPP-A	s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A (z angl. „Pregnancy Associated Plasma Protein-A“)
PE	preeklampsie
PIGF	placentární růstový faktor (z angl. „Placental Growth Factor“)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. „Polymerase Chain Reaction“)
PPROM	předčasný odtok plodové vody před termínem porodu (z angl. „Preterm Premature Rupture of Membranes“)
PROM	předčasný odtok plodové vody (z angl. „Premature Rupture of Membranes“)
PRR	receptor pro rozpoznávání vzorů (z angl. „Pattern Recognition Receptors“)
PTX3	pentraxin 3
qRT-PCR	kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (z angl. „Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. „Ribonucleic Acid“)
ROC křivka	graf popisující popisuje kvalitu binárního klasifikátoru v závislosti na nastavení jeho klasifikačního prahu (z angl. „Receiver Operating Characteristic“)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. „Reactive Oxygen Species“)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. „Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electro Phoresis“)
sFLT-1	solubilní tyrozinkináza 1 (z angl. „Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1“)
Sulfo-NHS	sulfovaný N-hydroxysukcinimid
T _h 1	pomocné T lymfocyty (z angl. „Helper T-Cell“)

TGF- α	transformující růstový faktor alfa (z angl. „Transforming Growth Factor Alpha“)
TGF- β	transformující růstový faktor beta (z angl. „Transforming Growth Factor Beta“)
TLR	Toll-like receptor (z angl. „Toll Like Receptor“)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. „Vascular Endothelial Growth Factor“)

ÚVOD

V průběhu těhotenství se v děložní dutině vytváří plodová voda. Ta slouží k mechanické ochraně plodu, zajišťuje optimální prostředí pro správný růst a vývoj plodu. Během těhotenství se mění nejen její objem, ale i její složení. Patofyziologické změny v objemu, barvě nebo složení plodové vody mohou poukázat na už probíhající patologické stavy. Tyto změny často vedou k předčasnému odtoku plodové vody (PROM) a předčasnému porodu.

Předčasný porod je definován jako porod před 37. týdnem těhotenství a ve chvíli, kdy k němu dojde, se zvyšuje riziko vzniku vážných komplikací, jež mohou postihnout matku i plod. K předčasnému odtoku plodové vody a předčasnému porodu může dojít z několika různých příčin. Mezi ty nejčastější se řadí intrauterinní zánět, vícečetné těhotenství, preeklampsie nebo zvýšené riziko předčasného porodu u matek, u nichž k tomuto porodu došlo již v předchozím těhotenství.

Má-li gynekolog podezření na předčasný odtok plodové vody, musí být pacientka ihned hospitalizována. Nejdůležitější je pro gynekologa zjistit, jestli se u pacientky nerozvíjí intrauterinní zánět, který by ohrozil vyvíjející se plod. K tomu zánětu se používá plodová voda odebraná matce tzv. amniocentézou.

Intrauterinní zánět je nejčastěji vyvolán mikroorganismy. Jejich průkaz a identifikace je prováděna tradiční kultivační metodou doplněnou o biochemické identifikace patogenních bakterií. Pro identifikaci intrauterinního zánětu je doba od odběru k získání výsledků v takovém případě relativně dlouhá a neposkytuje lékaři informaci o ohrožení plodu, případně matky, včas.

U intrauterinního zánětu dochází poté ke zvýšení některých biomarkerů (např. interleukin 6 (IL-6), kalretikulin (CALR), C-reaktivní protein (CRP) a pentraxin 3 (PTX3)). Tyto biomarkery jsou v praxi stanovovány tradičními imunoanalytickými metodami pomocí automatických imunoanalyzátorů s vysokou citlivostí detekce, např. elektrochemiluminiscenčně. Tato vyšetření také poskytují informaci o počínajícím zánětu i o jeho průběhu v čase, výsledek je k dispozici během několika hodin, ale žena musí být vyšetřována v relativně krátkých intervalech, a proto musí být i při podezření na zánět hospitalizována. Proto je v současné době snaha vyvinout

test, jenž by splňoval tzv. POC parametry. Výhodou tohoto testu je jednoduchost analýzy, bez vybavené laboratoře hned u lůžka pacientky a mohl by jej provádět i proškolený zdravotnický personál. V případě POCT se uvažuje i o možnosti, že by si žena prováděla vyšetření sama v domácím prostředí. Teprve v případě pozitivního testu by kontaktovala svého lékaře.

Kalretikulín (CALR) je glykoprotein, jenž se nachází v endoplazmatickém retikulu (ER) všech buněk. Při intrauterinním zánětu se jeho koncentrace v plodové vodě zvyšuje s délkou a intenzitou zánětu.

Vysoce citlivá imunoanalytická metoda pro stanovení kalretikulínu je v současné době k dispozici v každé větší biochemické nebo imunologické laboratoři, ale rychlý kvantitativní test pro průkaz kalretikulínu, případně dalších biomarkerů zánětu, není dnes v klinické praxi používán. Tato diplomová práce řeší jeden z dílčích kroků vývoje senzoru pro rychlé a semikvantitativní stanovení kalretikulínu v plodové vodě.

1 TEORETICKÁ ČÁST

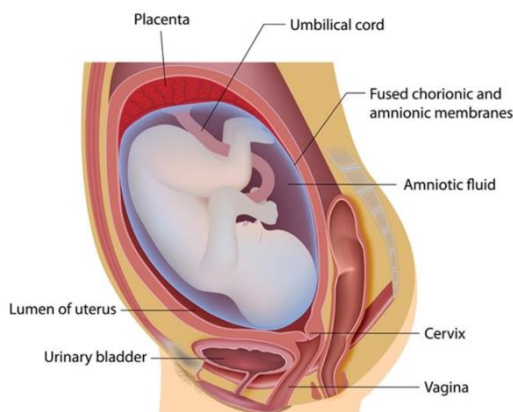
1.1 Plodová voda

V dutině děložní se během těhotenství tvoří plodová voda, též označována jako amniotická tekutina. Ta obsahuje potřebné živiny a růstové faktory ovlivňující správný vývoj, růst a mechanickou ochranu plodu [1]. Dále se v plodové vodě objevují antimikrobiální látky, které mají za úkol chránit plod před infekcemi. Tyto látky podávají i informaci o stáří plodu, případně o patologických stavech v období těhotenství [2].

Složení plodové vody v určitém období gravidity informuje nejen o stáří plodu, ale i o vývojových poruchách nebo o infekci, rozvoji zánětu a dalších patologických stavech spojených s graviditou. Odběr plodové vody (amniocentéza) je nedílnou součástí vyšetření při podezření na různé komplikace v průběhu celého těhotenství.

1.1.1 Fyziologie a funkce plodové vody

Plod se vyvíjí v amniotickém (plodovém) vaku, který se nachází uvnitř dělohy. Plodový vak je tvořen vnitřní membránou, amnionem, a vnější membránou, chorionem [3]. Amniotický vak vzniká z extracelomické dutiny, tato dutina se objevuje ještě předtím, než dojde k zahníždění embrya [1]. Amniotická tekutina se tvoří z mateřské plazmy a prochází do plodových membrán pomocí hydrostatických a osmotických sil. Tato tekutina se objevuje během prvních 12 dnů intrauterinního života v plodovém vaku (Obrázek 1) [1,3].



Obrázek 1: Schéma plodu obklopeného v plodových obalech v břišní dutině matky, převzato z [3]

Amniová tekutina je dynamické a komplexní prostředí, které se mění v závislosti na postupující graviditě [2,3]. Zbarvení plodové vody je slámově žluté a jedná se o čirou nebo mírně zakalenou tekutinu s pH 7,1 až 7,3 [3,4]. Bod tuhnutí plodové vody se nepatrně pohybuje pod bodem tuhnutí vody a hustota amniové tekutiny je vyšší než u vody [4].

Objem plodové vody je regulován rovnováhou mezi mateřským, fetálním a placentárním systémem. Množství plodové vody se v průběhu gravidity mění. Během vývoje embrya je nárůst objemu amniové tekutiny rychlejší než jeho velikost, to umožňuje embryu se dobře pohybovat [5]. Objem amniové tekutiny se postupně a rovnoměrně zvyšuje z 25 ml v 10. týdnu gravidity přibližně na 400 ml ve 20. týdnu gravidity. Během této doby má plodová voda podobné složení jako fetální plazma [1,3]. V rané fázi druhé části trimestru je objem amniové tekutiny téměř 2000 ml, vzniká tzv. polyhydramnionu, který je ale fyziologický [5]. Nárůst objemu plodové vody trvá až do 33. nebo 34. týdne gravidity, kdy je amniové tekutiny cca 800 ml, tento proces probíhá pouze u fyziologických gravidit. Největší objem plodové vody je ve 36. až 38. týdnu, poté se postupně snižuje a ve 40. až 42. týdnu těhotenství je množství plodové vody 400 až 700 ml [5].

Objem amniové tekutiny a transport látek v plodové vodě může být ovlivněn hormonální změnami nebo vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF) [6,7]. Po časné fázi gravidity se ve fetálních membránách objevuje méně významných receptorů pro progesteron a estrogen. Mateřské i fetální buňky ale produkují dostatečné množství receptorů pro prolaktin, jejich počet roste v průběhu těhotenství [8]. Jsou důkazy o tom, že prolaktin má vliv na amniotickou propustnost, ale zřejmě se nejedná o jediný mechanismus související s růstovými nebo hormonálními faktory. VEGF podporuje vývoj cév v amnionu a ovlivňuje permeabilitu mikrovláken, které omývají placentární a fetální povrchy [9].

Gynekologové používají pro správné změření objemu amniové tekutiny např. ultrasonografii pro určení výšky sloupce amniové tekutiny (SDP) nebo určení indexu plodové vody (AFI) [10].

Amniová tekutina má velkou spoustu důležitých funkcí, jako jsou např. funkce výživné, ochranné ale i diagnostické [1]. V případě, že je mateřské břicho předmětem traumatu (rány, otřesy), je hlavní funkcí plodové vody mechanická ochrana plodu.

Plodová voda snižuje riziko komprese mezi plodem a stěnou dělohy tím, že chrání pupeční šňůru, tím že vytváří tzv. polštář mezi plodem a pupeční šňůrou. Pupečnicková šňůra je důležitá pro přenos potravy a kyslíku z placenty k plodu [11].

Dále se plodová voda účastní správného vývoje plodu (plodových orgánů, vývoj plic, pohybového aparátu, gastrointestinálního traktu atd.) a odvodu odpadních látek. Plodová voda udržuje stálou teplotu plodu, izoluje a udržuje plod v teple. Díky její mazlavé konzistenci, zabraňuje společnému srůstu částí těla (prsty na nohách a rukách). Je-li snížen objem plodové vody, může dojít k jejich srůstu [3].

Další funkcí plodové vody je, podíl na vrozeném imunitním systému. Plodová voda je fyziologicky sterilní a až do začátku porodu má bakteriostatické vlastnosti [1]. Vrozený imunitní systém (IS) chrání plod před infekčními agens pomocí svých přirozených antibakteriálních vlastností, jeho součástí jsou fyziologické a anatomické bariéry, antimikrobiální peptidy, enzymy. Také uvolňuje prozánětlivé mediátory makrofágů a neutrofilů [12]. Kalprotektin, laktoferin, alfadefenziny, lysozym, psoriazin, inhibitor sekreční leukocytázové aktivity, všechny tyto látky produkované vrozeným IS byly objeveny v plodové vodě a vernixu (maz na povrchu plodu) a bylo zjištěno, že mají antimikrobiální vlastnosti. Jedná se o silné antimikrobiální látky se širokospektrým účinkem proti všem mikroorganismům [3,12].

1.1.2 Složení plodové vody

Amniová tekutina je složena z 98-99 % z vody, ale pouze na počátku gravidity. Od 8. až 10. týdne těhotenství plod tuto tekutinu polyká a zpracovává v ledvinách. Později ji vylučuje jako fetální moč do plodové vody. Přibližně ve 20. týdnu je voda v amniové tekutině úplně nahrazena fetální močí od plodu a plicními sekrety [1,5].

Kromě vody obsahuje nerozpustné a rozpustné látky, které tvoří 1-2 %. Mezi látky rozpustné patří organické látky a látky anorganické. Živiny (lipidy, proteiny, uhlohydráty, glukóza), laktát, pyruvát všechny se řadí mezi látky organické. Do této skupiny se také řadí hormony, enzymy, protilátky, kreatin, aminokyseliny (AMK), urea nebo chloupky a mázek od laguna [13].

Mezi anorganické látky patří chloridy, sodík nebo oxid uhličitý. Všechny tyto látky jsou v amniové tekutině ve vyšších koncentracích. Dále se v plodové vodě objevují fosfáty, draslík, hořčík a vápník, ty jsou ovšem zastoupeny v nižších

koncentracích. Z fyzikálně-chemického pohledu můžeme říct, že amniová tekutina má heterogenní složení [13].

Nejčastějším produktem choriových a amniových buněk v amniové tekutině jsou bílkoviny. Jejich hladiny se postupně zvyšují až do 13. týdne gravidity, poté dochází k jejich poklesu. Stanovit bílkoviny lze odstředěním (centrifugací) amniové tekutiny. Dále se pak používá supernatant, z něhož lze zjistit hladinu bílkovin v amniové tekutině pomocí radiální difúze nebo diskové elektroforézy [14].

Stejně jako mateřské mléko obsahuje plodová voda taurin (AMK). Dále plodová voda obsahuje glutamin, jenž je důležitý pro biosyntézu nukleových kyselin ve všech buňkách, nebo arginin. Arginin svojí rolí ovlivňuje především vývoj placenty, ale i plodu [15]. V plodové vodě se také nachází vysoké hladiny epidermálního růstového faktoru (EGF). EGF je syntetizován amniovou membránou, ale jeho funkce je prozatím neznámá [16].

Transformující růstový faktor alfa ($TGF-\alpha$) se svojí strukturou podobá EGF a také se váže na stejný receptor. Bylo prokázáno, že amnion má regulační úlohu při růstu a vývoji plodu, protože amniové buňky pupečnickové šňůry produkují $TGF-\alpha$, EGF a funkční receptor EGF/ $TGF-\alpha$. Dále bylo prokázáno, že EGF a $TGF-\alpha$ stimuluje produkci povrchově aktivních složek [17].

V pozdním stádiu těhotenství se v plodové vodě nachází transformující růstový faktor beta ($TGF-\beta$). Jeho hlavní funkcí je, že urychluje rychlost hojení intestinálních ran pomocí stimulace buněčné migrace a indukuje terminální diferenciaci střevních epitelálních buněk. $TGF-\beta$ také dokáže stimulovat produkci imunoglobulinu A [1].

Další látkou, která se v plodové vodě vyskytuje je erythropoetin (EPO). Hladiny EPO jsou vysoké, ale jeho úloha není u plodu a novorozence zcela jasná [18]. V lidské amniové tekutině se nacházejí i hematopoetické faktory stimulující kolonie granulocytů (G-CSF) a makrofágů (M-CSF). Oba faktory se objevují v amniové tekutině zdravých žen, ale i těch žen, kterým předčasně odtekla plodová voda. G-CSF působí jako topický růstový faktor ve fetálním a novorozeneckém střevě. Hladina G-CSF se zvyšuje v séru žen, které mají subklinickou chorioamnionitidu, u předčasného prasknutí membrán a v pupečnickové krvi novorozence s infekcí. Není vyloučeno, že G-CSF a M-CSF se účastní preventivní ochrany plodu v amniové tekutině, nebo jsou vylučovány jako vedlejší produkty odpovědi imunitního systému na infekci [1].

Látky, které jsou součástí vrozeného IS, se nacházejí i v amniové tekutině a mají významné antimikrobiální účinky. Mezi tyto látky patří alfadefenziny [HNP1-3 lidský neutrofilní defenzin], lysozym, katelicidin, inhibitor sekreční leukocytové proteázy, psoriazin, laktoferin a protein zvyšující baktericidní permeabilitu [12]. Všechny tyto látky mají silné antimikrobiální účinky a svými funkcemi zajišťují plodu širokospektrální aktivitu proti virům, bakteriím, houbám nebo prvokům. Nejdůležitější roli hrají alfadefenziny [HNP1-3]. Vyskytují se ve vysokých koncentracích v amniové tekutině u těhotných žen bez známek zánětu. Koncentrace alfadefenzinů [HNP1-3] se zvyšuje u žen s předčasným odtokem plodové vody před termínem porodu (PPROM), chorioamnionitidou a s předčasným prasknutím membrán [1].

Počet monocytů, histiocyty a makrofágů (mononukleárních buněk), jenž se nachází v amniové tekutině, je obvykle omezený. Dojde-li u plodu k defektu neurální trubice, hladina těchto buněk se zvýší. Zatím není zcela jasný důvod, proč jsou tyto buňky přítomny v takovém množství. Lékaři se domnívají, že je to proto, aby došlo k zabránění infekce z důvodu narušení kůže plodu nebo jestli tyto buňky slouží jako zachycovací buňky k čištění zbytků nervů [19].

U těhotných žen, které čekají zdravé dítě, nejsou normálně nalézány neutrofilie v plodové vodě, ale jejich hladiny mohou sloužit jako biomarker infekce v plodové vodě [1]. Takové neutrofilie mají pouze fetální původ a pravděpodobně pocházejí z fetálních cév chorionu [19].

V amniové tekutině se nacházejí i složky chránící plod před zraněním nebo infekcí, ale nemají imunitní povahu. Příkladem jsou polyaminy, které mají kationtový náboj a účastní se boje proti mikrobům a mají i výživnou roli [20]. Amniová tekutina dokáže chránit střevo plodu před účinky trombocyty aktivujícího faktoru (PAF). PAF se zapojuje do patofyziologie nekrotizující enterokolitidy u předčasně narozených dětí a je silným vasokonstrikčním faktorem. Koncentrace PAF je v plodové vodě po celou dobu gravidity nízká, ale ve chvíli, kdy dojde k porodu, se jeho koncentrace až osminásobně zvýší. Také se jeho koncentrace zvyšuje u předčasných porodů [21].

1.1.3 Odběr plodové vody

V České republice byla poprvé provedena amniocentéza neboli odběr plodové vody v roce 1971. Ze začátku byla prováděna bez přímého ultrazvuku, ten se začal používat až v roce 1989 [22]. Amniocentéza patří mezi nejběžnější fetální invazivní metody používající se pro prenatální diagnostiku plodu [23]. Při amniocentéze lékař odsává pomocí dlouhé jehly z amniotického vaku amniotickou tekutinu, spolu s ní odsaje i část odloupaných buněk plodu. Odsáté buňky pak mohou laboranti/ky v laboratořích namnožit a vyšetřit společně s plodovou vodou [24].

Obvykle je tato metoda používána pro testování aneuploidie (genomová mutace) plodu nebo vrozených vývojových vad, ale dnes už se běžně používá i k průkazu biomarkerů intraamniotické infekce (IAI) [23].

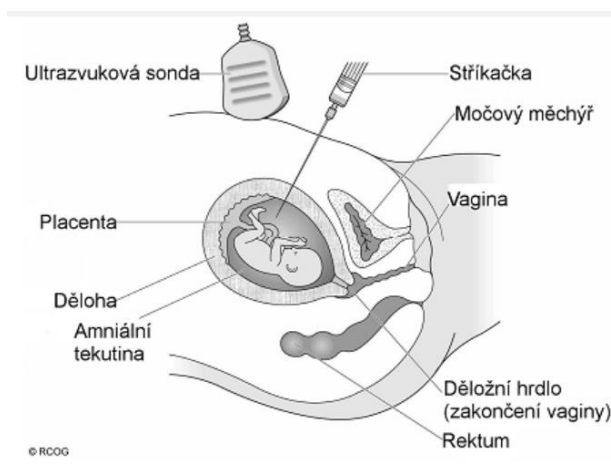
K odběru amniotické tekutiny existuje velké množství indikací. Na základě různých rizik lékař v genetické laboratoři navrhně těhotné ženě amniocentézu a ona se pak sama rozhodne, jestli ji podstoupí. Na odběr jsou např. posílány těhotné ženy se zvýšeným rizikem aneuploidie plodu v kombinovaném testu, nebo ženy s abnormální genetickou sonografií (pozitivní hlavní marker měkkých tkání nebo dva pozitivní menší markery měkkých tkání). Dále jsou posílány těhotné ženy mající v anamnéze vyváženou translokaci nebo zvýšené riziko genetického onemocnění, tzn. autozomálně recesivní onemocnění u obou rodičů nebo X-vázané recesivní onemocnění (cystická fibróza, hemofilie, svalová dystrofie) [23]. Další indikací jsou přenosná mateřská onemocnění (zarděnky, cytomegalovirus, herpes simplex nebo toxoplazmóza) [25]. Významnou roli může hrát i věk matky (nad 35 let), protože je zde narůstající riziko vzniku chromozomálně podmiňujících vad (Downův, Edwardsův, Patauův nebo Turnerův a Klinefelterův syndrom) [23]. Dalšími důvody, proč poslat těhotnou ženu na amniocentézu, jsou opakované potraty v předešlých graviditách. Neexistují žádné absolutní kontraindikace, jež by odrazovaly od odběru plodové vody. Jsou ale relativní komplikace, mezi které patří např. pacientky, jež mají infekci, nebo matky užívající antikoagulacia [26].

Nejčastěji se plodová voda odebírá mezi 16. až 18. týdnem gravidity [23]. Amniocentéza, která se provádí před fúzí membrány, může být spojena s vyšší šancí na neodsátí dostatečného množství amniotické tekutiny při jednom vpichu. Tento způsob

je nebezpečný tím, že čím více vpichů lékař provede, tím je větší šance ke vzniku komplikací [16].

Před vlastním odběrem (i po celou dobu odběru) je provedeno ultrazvukové vyšetření, aby se mohlo zkontrolovat umístění a počet plodu/ů v děloze, jejich životaschopnost, umístění placenty nebo gestační věk. Dále se ultrazvukem kontrolují případné malformace [27]. Odběrový personál potřebuje sterilní tampóny a závěsy, stříkačku o objemu 2 ml a 10 ml, jehlu o rozměru 20 až 22 cm, kontejnery pro sběr a přepravu vzorků, a nakonec 5% roztok jodovaného povidonu [23].

Během celého výkonu je potřeba, aby byl zabezpečen aseptický odběr, nepoužívá se narkóza, lokální anestézie ani profylaktická antibiotika [23]. Výkon lze provádět dvěma způsoby, buď metodou od ruky pod ultrazvukovým vedením, nebo lze používat naváděnou jehlu připojenou k sondě. Přes přední stěnu břišní se zavede tenká jehla, tak aby nedošlo k poranění plodu ani matky (Obrázek 2).



Obrázek 2: Odběr plodové vody, převzato z [28]

Odběrovému personálu je doporučeno, aby udělal pevný vstup do amniotické dutiny pro zabránění napínání amniotické membrány [27,29]. Z celkového množství plodové vody se odebírá 10-20 ml do injekční stříkačky. První 1-2 ml plodové vody jsou zlikvidovány, protože je zde nejvyšší šance na kontaminaci mateřskými buňkami. Pro vyšetření nedostatku enzymů a IAI se odebírají 2-5 ml, pro vyšetření karyotypů se odebírá 18-20 ml plodové vody. Poté, co získá odběrový personál dostatečné množství plodové vody, dojde k odstranění jehly a zkontroluje se srdeční činnost plodu. Důležité je, aby nedošlo ke vstupu do plodové vody placentou, protože

se zvyšuje pravděpodobnost krvácení, zejména u Rh negativních matek. Těmto ženám je také nutno podávat anti-D [23,27].

Riziko komplikací je minimální, ale komplikace se mohou vyskytnout jak u plodu, tak u matky. Udává se míra ztráty plodu 0,11 %. Ztráta plodu do 28 dnů po výkonu je v 0,56 % případů a do 42 dnů je to 0,09 % případů. Únik plodové vody je 1-2 % a obvykle bývá spojeno se spontánním utěsněním membrán [27]. Ve 2-3 % případů se může objevit vaginální krvácení. Také je téměř zanedbatelné procento (0,1 %) přenosu kožních bakterií do amniotické dutiny a vzniku chorioamnionitidy nebo děložní infekce. Samotný výkon může zvýšit riziko PPRM nebo oligohydramnionu. Je zde i minimální šance na poškození plodu, především očí nebo kůže. Byla popsána i bolest po zákroku a nepohodlí matky [23].

V případě, že odběrový personál musí píchnout jehlou více než třikrát, existuje zde větší riziko komplikací. Pokud lékař nezíská dostatečné množství plodové vody po 2 bodnutí, měl by od procedury upustit a vyzkoušet ji nejdříve za 24 hodin [23]. Důležitou roli při amniocentéze hraje umístění dělohy, protože jakmile dojde k průchodu jehly placentou, je zde mnohem vyšší riziko vzniku předčasného porodu [28,30]. Až u 86 % pacientek byla amniocentéza bezpečná a bez jakýkoliv komplikací.

Po odběru se vzorek plodové vody posílá do laboratoře, kde je dále zpracováván. Plodová voda se vyšetřuje biochemicky, kdy se stanovuje hladina některých enzymů, bílkovin a markerů (α -fetoprotein (AFP), γ -glutamyltransferáza (GGT), acetylcholinesteráza (AChE)) [31]. Tento typ vyšetření umožní lékaři získat informace o poruchách přední stěny břišní, uzávěru hlavičky páteře plodu, otevřeném defektu neurální trubice (především hladiny AChE a AFP) nebo o riziku vzniku cystické fibrózy (snížené hladiny GGT) [32].

V plodové vodě se nacházejí buňky plodu, ale jejich velmi málo. Chce-li lékař získat těchto buněk víc, je potřeba v laboratoři tyto buňky nejprve oddělit centrifugací a pak namnožit metodou kultivace na tkáňové kultuře. Tato kultivace trvá přibližně 2 až 3 týdny [23]. Poté jsou namnožené buňky fixovány a barveny. Následně jsou buňky hodnoceny v optickém mikroskopu a z takto namnožených buněk lze získat informace o počtech chromozomů a jejich tvaru, jejich struktuře a chromozomálních aberacích. Cytogenetické vyšetření lékaři poskytne informace o chromozomové

přestavbě (inverze, translokace, deplece, duplikace), ale neposkytne informace o mikrolečnicích syndromech [32].

V plodové vodě lze vyšetřit chromozomální aberace plodu. Test využívá kvantitativní fluorescenční polymerázovou řetězovou reakci (qRF-PCR) a fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH). Tyto metody zjistí mutace v genech a aneuploidie u plodu. Metody qRF-PCR a FISH jsou založeny na kvantitativním hodnocení amplifikace konkrétních úsecích DNA (deoxyribonukleová kyselina) na určených chromozomech (chromozom 13, 18, 21, X a Y) [33].

1.2 Plodová voda a patologické stavy v těhotenství

1.2.1 Oligohydramnion a polyhydramnion

Správný objem plodové vody je důležitý pro vývoj plodu, proto odlišnosti v jeho množství mohou ovlivnit jeho vývoj. Objem plodové vody je možné určit pomocí prenatalního ultrazvukového vyšetření. Díky tomuto vyšetření lze zjistit, zda se nejedná o rizikové těhotenství [34].

Za fyziologických okolností dochází k dynamické rovnováze, což je zajištěno tím, že je plodová voda neustále vyměňována mezi plodem a matricí. Tato výměna probíhá při polykání, dýchání, močení, keratinizaci kůže a pupeční šňůry. Když ztratí tento typ výměny rovnováhu, objevují se abnormality objemu plodové vody, buď její snížení, nebo její zvýšení [35].

První abnormalitou je snížený až nedostatečný objem plodové vody, též nazývaný oligohydramnion. Ten se většinou objevuje ve třetím trimestru gravidity. U těchto plodů mohou být viděny deformace končetin či malé nevyvinuté plíce. Příčinou sníženého objemu plodové vody může být malformace nebo dysfunkce ledvin, infekce nebo PPRM. V roce 2017 Hederlingová a spol. [36] publikovali studii, ve které bylo jejich cílem zjistit, jaký vliv má izolovaný oligohydramnion v posledních měsících gravidity na perinatální výsledky. Určili, že 0,5-5 % fyziologických těhotenství může mít snížený až nedostatečný objem plodové vody. Izolovaný oligohydramnion, který je objeven po 36. týdnu těhotenství, zvyšuje riziko porodu císařským řezem (z důvodu hypoxie) nebo indukce porodu. Avšak Hederlingová a spol. nezjistili, že se zvyšuje riziko některého z perinatálních

výsledků – snížené pH krve v pupečníku, perinatální mortalita nebo převoz novorozence na jednotku intenzivní péče [35-37].

Další abnormalitou může být zvýšený objem plodové vody neboli polyhydramnion. Abnormální množství plodové vody může ovlivnit bezpečnost jak plodu, tak i matky. Při polyhydramnionu se objem plodové vody zvýší na 2000 ml (ale i více) a objevuje se u 0,5-1 % pacientek. Někteří vědci uvádějí, že anomálie plodu se vyskytují u 20-50 % pacientek mající zvýšený objem plodové vody, přičemž nejvíce je postižen horní zažívací trakt, srdce (srdeční vady) a nervový systém plodu (hydrocefalus, hypoplazie mozečku kombinovaná s rozštěpem páteře). Tato všechna postižení mohou být spojena s nedostatkem antidiuretického hormonu, jenž zvyšuje množství moče, a to vede k polyhydramnionu nebo poruše funkce polykání [35]. V tomto případě není příčina zcela jednoznačná. Až 60 % případů má nevysvětlitelný idiopatický polyhydramnion. Zhruba u 12-30 % pacientek je příčina spojena s fetální anomálií [38]. Dále může být příčina spojena s věkem, různými nemocemi (Diabetes mellitus, virová hepatitida) nebo s mateřskými faktory. Li-Ling a spol. v roce 2016 [39] publikovali studii, ve které se zajímali o 50 žen se zvýšeným objemem plodové vody. Jejich cílem bylo prozkoumat etiologické a těhotenské výsledky těhotných žen pomocí prenatalní diagnostiky (fetální chromozomální karyotypová analýza plodové vody, pupečnickové krve). 22 žen mělo nevysvětlitelný idiopatický polyhydramnion, zbytek žen měl chromozomální abnormality, alfa-talasémii nebo fetální anomálie. U těchto pacientek byl vyšší výskyt předčasných porodů (až 56 %), porodů císařským řezem, fetální makrozomie nebo fetální anomálie (až 75 %) či úzkost než u těhotných žen bez polyhydramnionu. U 15 pacientek byla zjištěna fetální anomálie (cca 30 %), u dvou se jednalo o chromozomální abnormality (cca 4 %). V dalších dvou případech šlo o trizomie 18. a 21. chromozomu. Studie dále objevila výskyt polyhydramnionu v 17. týdnu, nejpozději ve 32. týdnu těhotenství [39]. Studie dává důraz na prenatalní diagnostiku u gravidních žen mající polyhydramnion, protože vlivem těžké nerovnováhy elektrolytů může dojít až k úmrtí plodu.

1.2.3 Preeklampsie

Preeklampsie (PE) je velmi závažná komplikace vyskytující se v těhotenství. PE se objevuje ve 4-5 % těhotenství po celém světě a je spojována s krátkodobě se rozvíjejícím zánětem [40]. Zvýšený výskyt PE je popisován především v rozvojových zemích z důvodu nižší dostupnosti kvalitní těhotenské péče [41].

PE je definována jako nově vzniklá arteriální hypertenze nad 140/90 mmHg a proteinurie nad 300 mg/den, ke které dochází po 20. týdnu těhotenství [42]. Eklampsie je rozvoj křečovitých stavů u žen s preeklampií [43]. Toto onemocnění je spojováno s vysokou mateřskou a fetální mortalitou i morbiditou.

První zmínky o PE se pojí s rokem 1637, kdy Francois Mauriceau [44] popsal vysoké riziko záchvatů u těchto pacientek. Záchvaty připisoval k abnormální průtoků krve nebo intrauterinní smrti plodu. V roce 1843 byla PE definována Leverem, když přišel na to, že moč žen s PE obsahovala albumin. Ve stejném roce přišel Johnsen s tím, že u pacientek pozoroval bolesti hlavy, změny zraku a edému [44].

V posledních dvaceti letech došlo k velkému pokroku v pochopení PE, ale základní patogeneze tohoto onemocnění je zatím stále neznámá [45]. Na vzniku se podílí několik rizikových faktorů, mezi které se řadí např. vyskytující se PE v minulém těhotenství nebo v rodině, vícečetné těhotenství, Diabetes mellitus, onemocnění ledvin (akutní i chronické) a Systémový lupus erythematosus. Mezi další rizikové faktory se řadí obezita rodiček, vyšší věk matky, žena, která nikdy nerodila nebo malnutricie. Svoji roli při vzniku PE hraje i genetická predispozice (až 55 %), hypertenze matky, *in vitro* fertilizace nebo kouření v době těhotenství [46,47].

PE může být způsobena endoteliální dysfunkcí a abnormální placencí s následnou generalizovanou vazokonstrikcí. PE má dvě fáze, preklinickou a klinickou. Dysbalance faktorů, které jsou produkovány placentou v první (preklinické) fázi způsobuje druhou (klinickou) fázi PE u matky [41]. První fáze se projevuje abnormální placentou s mělkou a nedostatečnou invazí cytotrofoblastu, proto se jí často říká placentární syndrom. Cytotrofoblast není schopen indukovat remodelaci maternálních spirálních arterií, tím dochází k nedostatečnému zásobení plodu krví (snížený průtok krve placentou). Důsledkem toho je nedostatek živin pro plod a jeho pomalejší růst s menším objemem plodové vody [63,64]. Mezi běžně nalézané patologie u preeklamptických placent se řadí ateroskleróza, sklerotické zúžení

tepen a arteriol, ukládání fibrinu a infarkty [48]. Některé spirální arterie mohou být intaktní, mají vysokou vaskulární rezistenci s malým objemem. Následkem je snížená uteroplacentární cirkulace a ischemie placenty, která podporuje zvýšenou tvorbu antiangiogenních faktorů (rozpustný tyrozinkinázový faktor 1 (sFLT-1), solubilní endoglin (sEng)) [41,42,49]. sFLT-1 má stabilní hladinu během prvního a druhého trimestru, ovšem ve třetím trimestru dochází k mírnému nárůstu jeho hladiny. U PE jsou jeho hodnoty mnohonásobně vyšší [42]. Tyto antiangiogenní faktory vylučují angiogenní faktory (VEGF, TGF- β) a placentární růstový faktor (PIGF). Hladina PIGF klesá s postupující graviditou, avšak u preeklampsie došlo ke snížení jeho hladiny už 9 týdnů před prvními příznaky [42]. Především antiangiogenní proteiny hrají významnou roli jako patogenní mediátory PE a jejich objev dokázal poskytnout nové diagnostické postupy pro objevení PE a její následné léčení [49,50].

Do krevního oběhu matky se vyplavují biologicky aktivní látky (zejména cytokiny) způsobující oxidační stres, a vlivem těchto změn dochází k endoteliální dysfunkci (aktivaci mateřského endotelu) a k vazokonstrikci (zúžení cév, které spojují krevní oběh plodu a matky). Tvoří se malé tromby a objevují se první symptomy PE [42,51]. Oxidační stres se objeví v případě, že je v buňce překročena antioxidační kapacita vlivem volných kyslíkových radikálů (ROS). Vlivem zvýšených hladin ROS dochází k poškození lipidů v buňkách [52].

Při PE hraje důležitou roli generalizovaná vazokonstrikce. Ta je způsobena endoteliální dysfunkcí a změnami v rovnováze prostaglandinů (tromboxan A₂, prostacyklin). Tromboxan A₂ patří mezi vazokonstriktory a působí proti prostacyklinu. V případě, že je jeho hladina vyšší než prostacyklinu, zhorší se průtok krve dělohou a k vzniká trombotizace spirálních arterií. Následně dochází k ischemii placenty. Prostacyklin má vazodilatační funkci, podporuje průtok krve dělohou, působí proti shlukování destiček a snižuje tlak krve [42].

Klinická fáze PE už zahrnuje klinické příznaky tohoto onemocnění, díky kterým se rozlišují dvě fáze PE – časná a pozdní, přičemž hranicí je 34. týden těhotenství [41,53]. Časná PE (EOP) je klinicky závažnější než pozdní PE (LOP). EOP je nejčastěji způsobena dysfunkcí placenty se závažnějšími fetoplacentárními, hematologickými a neurologickými komplikacemi a restrikcí růstu plodu, proto

se jí taky říká placentární [41,42]. LOP je většinou způsobena chronickým onemocněním matky (onemocnění ledvin, Diabetes mellitus, hypertenze, obezita), proto se jí často říká mateřská [46].

V klinickém obraze se jedná o rozmanité onemocnění. Lehká forma PE může být zcela bez příznaků, ale u těžkých forem PE dochází až poruše vědomí matky. U PE se objevuje hypertenze nad 140/90 mmHg a proteinurie nad 300 mg/den [42]. Mezi další příznaky se řadí otoky dolních končetin, bolesti hlavy, poruchy zraku, oligurie, bolest v oblasti epigastria a nauzea [12]. V laboratoři můžeme vidět zvýšené hladiny kyseliny močové, změny v koagulačních testech, změny v krevním obraze nebo zvýšené hodnoty jaterních testů [42]. Také může dojít k leukocytóze, jež může být i fyziologická, nebo ke zvýšení koncentrace CRP. U PE dochází k aktivaci nespecifické i specifické imunity. Objevuje se nerovnováhu u T-lymfocytů, kdy největší část představují pomocné T-lymfocyty a k nim přidružené cytokiny (tumor nekrotizující faktor (TNF), interferon gama ($INF\gamma$)) [54]. Vlivem této nerovnováhy se objevuje špatná placentace a následně i zánět matky a endoteliální dysfunkce. I aktivace komplementu se účastní patogeneze preeklampsie a je závažná především u rozvoji závažných komplikací (HELLP syndrom) [55]. Zvýšené hladiny komplementu složky C3a v raném stádiu gravidity mohou poukazovat na zvýšenou pravděpodobnost vzniku pozdější PE. Aktivace komplementu může snížit produkci VEGF, zvýšit hladiny tumor nekrotizujícího faktoru alfa ($TNF\alpha$) a způsobit abnormální placentaci až potrat [56]. Také NK buňky (natural killer cells) s monocyty zahajují zánětlivou reakci a ovlivňují správnou placentaci [55]. Pacientky s PE mají vyšší míru zánětu v prostředí placenty a zvýšenou aktivitu a migraci polymorfonukleárních neutrofilů, jejich infiltrace placenty odráží závažnost tohoto onemocnění [57,58]. Zvýšená aktivita polymolekulárních neutrofilů může být způsobena zvýšenou hladinou některých proteinů a enzymů, již jsou charakteristické pro neutrofile (alfadefenziny, myeloperoxidázy) [58,59]. Dalším proteinem je kalprotektin, jenž je také asociován s neutrofilem a jeho hladina je zvýšena u pacientek s PE. Se závažností onemocnění PE také souvisely zvýšené hladiny lipokalinu, který je asociován se želatinázou v neutrofilech [60]. Zvýšené hladiny všech těchto látek ukazují na zvýšenou aktivitu neutrofilů u žen s PE, ta dále vede k degranulaci zánětlivé odpovědi a patofyziologickému zánětu. Ten svým způsobem

dokáže narušit průtok krve placentou a následně ji i poškodit [41], což vede k nedostatečnému zásobení plodu.

V posledních letech se u všech těhotných žen dělá screeningové vyšetření, které zahrnuje vyšetření PIGF v prvním trimestru těhotenství [61]. Další vyšetření jsou měření středního arteriálního tlaku, stanovení specifického těhotenského proteinu a dopplerovské vyšetření pulzatilního indexu uterinních arterií. Následně počítač vyhodnotí riziko vzniku preeklampsie v průběhu celé gravidity [42].

Jako prevence vzniku onemocnění se pacientkám s pozitivní screeningovým vyšetřením může podávat do 16. týdne těhotenství kyselina acetylsalicylová, která snižuje riziko vzniku PE o 95 %. Po 16. týdně těhotenství už nemá význam podávat pacientkám tuto kyselinu, protože nijak výrazně nesnižuje riziko vzniku PE [42].

Mezi komplikace ovlivňující PE se řadí výše zmíněný HELLP syndrom (syndrom hemolýzy, zvýšené jaterní enzymy, trombocytopenie), eklampsie, diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), postižení CNS (centrální nervový systém), onemocnění ledvin, postižení očí, edém plic nebo odloučení lůžka (abrupce placenty) [42,43]. Samotná léčba je založena na porodu plodu a placenty, po kterém může dojít k regresi onemocnění. Během gravidity se lékaři snaží redukovat symptomy např. arteriální hypertenze se léčí pomocí metyldopaminu nebo betablokátorů. Dále je možné použít magnéziu sulfát, jenž má vazodilatační účinek a snižuje riziko vzniku křečí [48]. V posledních letech se zkoumají nové strategie léčby, které zahrnují injekci rekombinantních proteinů (VEGF, PIGF), inhibici sFLT1 pomocí malých molekul a RNA interference a selektivní vyčerpání cirkulujícího sFLT1 protilátkami [43]. Další volbou je nasazení aspirinu jako preventivního léku, jenž se podává pacientkám už v 16. týdně gravidity a snižuje riziko EOP o 50 %.

1.2.4 Syndrom aspirace mekonie

Lidská plodová voda může obsahovat různé, potenciálně škodlivé, látky. Nejvíce kontaminující látkou je mekonium (první stolice novorozence) [62]. Mekonium je černozeleň sterilní materiál, který je hustý, lepkavý a viskózní. Skládá se z vody, kožních a střevních deskvamačních buněk, gastrointestinálních sekretů, žluči a žlučových kyselin, pankreatických šťáv, krevních glykoproteinů, hlenu, lanuga

vernixu, fetální vosku a plodové vody [63]. Fyziologicky se mekonium nachází mimotělně, jeho složky jsou skryté a IS plodu je není schopen rozeznat.

Defekace v děloze je univerzální jev, proto se ve střevě plodu objevuje mekonium už kolem 12. týdne těhotenství. Za fyziologických podmínek se nedostane ze střeva plodu dříve než po porodu, protože plod má nefunkční peristaltiku a dobrý tonus análního svěrače. Občas se ale může mekonium uvolňovat do plodové vody a způsobit její jiné zbarvení, ale i problémy [63]. Většina plodů se dokáže vyvíjet i v přítomnosti mekonie bez klinického onemocnění. V případě, že se amniotická tekutina zbarví mekoniem (MSAF), jedná se o indikátor stresu plodu v důsledku hypoxie a acidózy způsobující vagovou odpověď (stimulaci bloudivého nervu). Ta vede ke zvýšení peristaltiky a uvolnění análního svěrače a k proniknutí mekonie do dutiny děložní [64]. Mezi rizikové faktory vyvolávající MSAF patří PE, placentární insuficience, mateřská hypertenze, oligohydramnion s kompresí pupeční šňůry během porodu, zneužívání nikotinu či kokainu během těhotenství nebo infekce [86]. Ze všech novorozenců s MSAF se jen u 3-12 % narozených dětí objeví Syndrom aspirace mekonie (MAS). Z toho 20 % novorozenců je v pořádku, 1/3 novorozenců potřebuje intubaci a mechanickou ventilaci během prvních dvou hodin života a 5-12 % narozených dětí umírá [65].

MAS je klinický stav projevující se respiračním selháním (tachypnoe, chrochtání) z důvodu MSAF vyskytujícího se u novorozenců. Patofyziologie není zatím zcela objasněna. Je to zřejmě dáno tím, že mekonium má komplikované složení a jeho identifikace není snadná. MAS je multifaktoriální onemocnění s různými patofyziologickými procesy, mezi které se řadí mechanické obstrukce dýchacích cest, zánětlivé reakce, narušení funkce povrchově aktivních látek a plicní arteriální hypertenze [65].

Obstrukce dýchacích cest se mnoho let považovala za hlavní patofyziologický mechanismus MAS [65]. Uzavření dýchacích cest z důvodu mekoniových zátek vede k vysokému odporu proti proudění vzduchu a zachycování vzduchu dle konzistence a množství plodové vody, která je zbarvená mekoniem. Je-li obstrukce částečná, vzniká hyperinflační stav, při obstrukci úplné dochází k atelektáze (nevzdušnost plicní tkáně). Zachycený plyn může vést k úniku vzduchu a způsobit intersticiální emfyzém, pneumotorax nebo pneumomediastinum [66].

Inaktivace povrchově aktivních látek v důsledku působení mekonických mastných kyselin vede k atelektáze a zhoršuje perfúzi a ventilaci. Její přesný mechanismus účinku není zcela objasněn. Zřejmě složky mekonium rozpustné v tucích mění viskozitu a ultrastrukturu povrchově aktivních látek (surfaktantů) prostřednictvím přímé toxicity na pneumocytech typu II [65]. Dále snižuje hladinu proteinů A a B, zhoršuje vazbu na plazmatické proteiny v důsledku poškození alveolárně-kapilární membrány za přítomnosti proteolytických enzymů a volných kyslíkových radikálů [66].

Arteriální plicní hypertenze se objevuje u 15-20 % pacientů s MAS a je spojována s nejrůznějšími mechanismy – plicní vazokonstrikce, kapilární hypertrofie nebo zvýšení plicní hyperexpanze (plicní rezistence) [66].

U MSAF byly nalezeny gramnegativní bakterie [67], endotoxin a vysoké koncentrace zánětlivých mediátorů, které plod polyká. To může znamenat zvýšenou peristaltiku střev, zánětlivé mediátory ukazují na průchod mekonium do dutiny děložní. Nedávné studie prokázaly mekonium v alveolech mrtvých novorozenců. Tato přítomnost naznačuje, že k průchodu mekonium *in utero* došlo ještě před smrtí v důsledku hypoxie tkání a zánětlivých procesů. Histologie vzorků také ukázala na zvýšený akutní zánět placenty. Přestože má plodová bakteriostatickou funkci, průnik mekonium (silný aktivátor zánětlivých kaskád) zhoršil její inhibiční účinky a zvýšil růst bakterií, především streptokoky skupiny B a *Escherichia coli* [68].

V alveolárním intersticiu pacientů s MAS byly objeveny zánětlivé buněčné infiltráty, které uvolňovaly cytokiny a aktivovaly komplement. Mekonium obsahuje látky s chemotaktickým účinkem na neutrofile, které aktivují komplement, mají vazoaktivní funkci a jsou zdrojem prozánětlivých mediátorů: interleukin 1 (IL-1), IL-6, interleukin 8 (IL-8) a TNF [87,91]. Navzdory reparační roli zánětu může jeho destruktivní potenciál způsobit lokální poškození tkáně. Mekonium je toxická látka, jež vyvolává zánět a apoptózu, vede k chemické pneumonii v prvních 48 hodinách života dítěte se zvýšeným rizikem vzniku bakteriální infekce [69]. Stále však není jasný buněčný mechanismus, jenž je základem iniciace zánětlivé kaskády. Mekonium lze rozpoznat jako látka tělu nevlastní, následně dochází k aktivaci vrozeného IS. Této aktivace se účastní Toll-like receptor (TLR) a komplementový systém, které poznají mekonium a spustí zánětlivou kaskádu. Lze předpokládat, že *in vivo* jsou dalšími

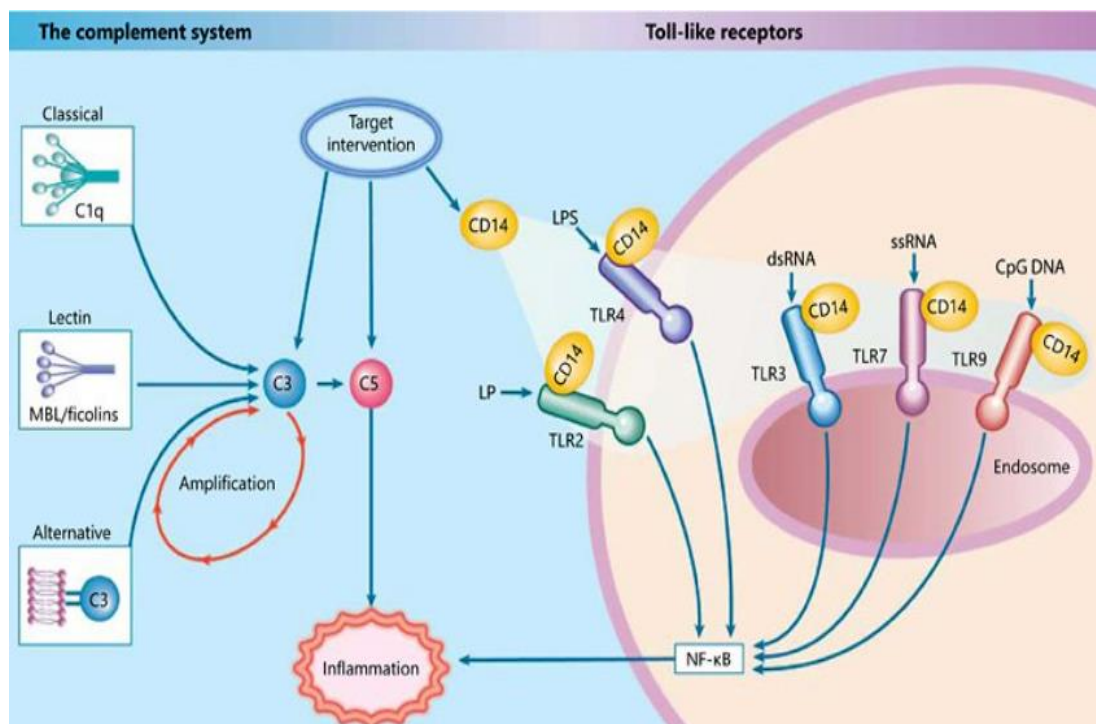
spouštěči zánětu hypoxie způsobená MAS, volutrauma nebo baotrauma, která souvisejí s ventilací a oxygenoterapií. Pochopení všech biomechanismů, které jsou základem spuštění zánětlivé kaskády u MAS by mohlo vést k novému řešení terapeutických strategií [65].

U experimentální MAS byly především zkoumány cytokiny, komplementový systém, ROS, oxid dusnatý, transkripční faktory nebo metabolity kyseliny arachidonové [70].

Cytokiny jsou molekuly pro mezibuněčnou komunikaci, indukují růst, diferenciaci, chemotaxi a zvýšenou cytotoxickou aktivitu vůči některým buňkám. Cytokiny jsou produkovány rodinou TLR. *In vitro* bylo prokázáno, že mekonium indukuje chemotaxi neutrofilů zprostředkovanou IL-8, jenž se zde nachází. U MSAF bylo zjištěno, že se zde objevují vysoké koncentrace TNF, IL-1, IL-6 a IL-8 a všechny mají chemotaktickou aktivitu na leukocyty [71]. Ve sterilním a kontaminovaném mekoniu bakteriemi byly porovnávány hladiny TNF, IL-1, IL-6 a IL-8. Přes odchylky mezi vzorky se jednotlivé hladiny nelišily [72]. Při narození sterilní mekonium může být infikováno bakteriemi nejméně 72 hodin po narození. Prozánětlivé látky nacházející v mekoniu (hem), dokážou primárně přímo vyvolat zánět plic a nepřímo indukují uvolnění cytokinů z alveolárních buněk [73]. V poslední době se objevují studie potvrzující výskyt vysokých hladin dalších prozánětlivých cytokinů (např. interleukin 10 (IL-10)), a to během 6 hodin od narození [74].

Komplementový systém je další humorální složkou nespecifické imunity, jež úzce interaguje s adaptivním IS. Nechrání tělo pouze proti patologickým agens, ale účastní se tkáňové homeostázy a odstraňuje zbytky regenerace tkání [75]. K aktivaci komplementu dojde vždy, když jsou prezentovány struktury, které IS fyziologicky neprezentuje. Mezi tyto struktury se řadí mikroorganismy, exogenní i endogenní struktury prezentující se na povrchu buněk po poškození (trauma, ischemicko-reperfúzní poškození). Komplement se aktivuje třemi různými cestami – klasická, lektinová, alternativní (Obrázek 3). Všechny tři aktivační dráhy se sejdou v hlavní C3 složce, pokračují k terminální dráze k C5a složce a terminálním komplementovým komplexem jako konečné produkty. C5a je potenciálně škodlivý zánětlivý mediátor a mekonium přes něj aktivuje neutrofilů *in vitro* [76]. Mekonium

má potenciální schopnost aktivovat počáteční dráhy komplementového systému na širším základě [73].



Obrázek 3: Aktivace komplementu a inhibice zánětu přes molekuly C3 a C5 a pomocí Toll-like receptoru, převzato a upraveno z [77]

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou prozánětlivé mediátory mající jako primární funkci ochranu hostitele, ale se silným potenciálem ho mohou i poškodit [78]. Komplementový systém indukuje ROS, zejména prostřednictvím C5a, které zprostředkovává oxidační vzplanutí leukocytů [79]. Vědci zjistili, že mekonium silně indukuje komplement-dependentní oxidační vzplanutí u lidských neutrofilů [76]. Ovšem role oxidativního vzplanutí u MAS je stále kontroverzní.

MAS je život ohrožující plicní onemocnění, které se obvykle objevuje u předčasně narozených dětí nebo novorozenců narozených až po termínu. Jestliže se ale u těchto dětí objeví, je spojeno s rizikem intraventrikulárního krvácení [1,62]. MAS má spojitost se zvýšenou morbiditou a mortalitou. Od 70. let minulého století se úmrtnost na MAS a je spojena s asfyxií a plicní hypertenzí [80]. Snížené úmrtí novorozenců je dáno hlavně tím, že je zlepšena péče i kontrola novorozenců na jednotkách intenzivní péče [63]. I když je míra přežití lepší, stále zůstává problémem dlouhodobá morbidita u přeživších novorozenců, protože jsou ohrožení

pneumonií, sníženou funkční reziduální kapacitou, astmatem, bronchiální hyperreaktivitou a až 5 % přeživších stále potřebuje kyslíkovou terapii do prvního měsíce života [81]. MAS je spojena s dlouhodobými poruchami neurovývoje bez ohledu na způsob porodu a léčbu.

Etiologie a patofyziologie MAS jsou komplikované, takže terapie MAS je stále zaměřena na léčbu příznaků a život podporující urgentní medicínu s omezeným zlepšením prognózy. V tomto případě se dá mluvit o tom, že MAS je velmi podobný sepsi a je zde naléhavá potřeba porozumět patofyziologii MAS, aby došlo ke zlepšení terapie a prognózy [77]. Na závěr lze říct, že mekonium je nebezpečným signálem pro vrozený IS a silně aktivuje komplement a TLR. K terapii MAS by proto mohla pomoci kombinovaná inhibice komplementového systému CD14 a intenzivní léčba v podobě ventilační podpory a podání surfaktantu [70].

Mezi další komplikace plodové vody patří předčasný odtok a zánět.

1.2.5 Předčasný porod

Předčasný porod je jednou z největších problematik v porodnictví a někdy není možné rozlišit těhotné pacientky s falešným nebo skutečným předčasným porodem. Předčasný porod způsobuje až v 70-75 % případů novorozeneckou morbiditu a mortalitu [82]. Přestože většina předčasně narozených novorozenců přežije, zvyšuje se u nich riziko neurologických vývojových vad (mozková obrna, mentální postižení) [83], respiračních nebo gastrointestinálních komplikací [84] a mohou být ohroženy zrakovým postižením [85]. Dále jsou tyto děti vystaveny vyššímu vzniku infekcí, což může přispívat ke zvýšené úmrtnosti [86]. V dospělosti se u těchto dětí může objevit Diabetes mellitus II. typu a u matek, které porodily předčasně, je po porodu zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárního onemocnění, Diabetes mellitus II. typu nebo rakoviny prsu [87].

Přesnou definici předčasného porodu představila v roce 1977 Světová zdravotnická organizace (WHO – World Health Organization). Předčasný porod je definován jako ukončení těhotenství před dokončeným 37. týdnem alespoň hodinu před začátkem kontrakcí. Předčasný porod má dopad medicinský, rodinný, ale i socioekonomický [84]. Jedná se o heterogenní komplikaci těhotenství s mnoha biologickými cestami vzniku [88].

Předčasný porod se dělí do dvou skupin, a to spontánní a iatrogenní předčasný porod. Spontánní předčasný porod představuje 70-80 % všech předčasných porodů a dochází k němu v důsledku spontánního porodu se zachováním plodových membrán (40-50 %) anebo předčasné ruptury plodových membrán s předčasným odtokem plodové vody [89]. Iatrogenní předčasný porod je indikován na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti faktorů, které ohrožují plod nebo matku. Tvoří 20-30 % všech předčasných porodů [89].

V České republice se incidence předčasného porodu delší dobu pohybuje okolo 8 až 10 % [90]. Přesná příčina předčasného porodu zatím není zcela objasněna, ale předpokládá se, že předčasný porod je vyvolán mnoha různými mechanismy, jež začínají už několik týdnů před přítomností klinických příznaků [91]. Každý z předčasných porodů může mít jedinečný biologický mechanismus, ale existují i společné cesty, protože mezi různými typy předčasných porodů jsou překrývající se rizikové faktory [92]. S předčasným porodem jsou spojeny různé mateřské nebo demografické behaviorální a klinické faktory. Řadí se mezi ně rasa matky a její etnická příslušnost, kouření cigaret, mladší i vyšší věk matky (nad 35 let) [93], psychický stres těhotné matky, předčasný porod v předchozím těhotenství [94], infekce močových cest, anémie a intrauterinní infekce [90]. Předčasný porod může být také způsoben jinými vlivy, jsou to genetické vlivy, endokrinní porucha hypotalamohypofyzoandrenální osy, distenze a ischemie myometria, onemocnění děložního hrdla, abnormální implantace plodového vejce, odloučení placenty, preeklampsie nebo imunologické onemocnění [90,95].

Včasně odhalení rizikových faktorů usnadňuje účinné prenatalní a postnatalní intervence a zahajuje specifickou léčbu u rizikových žen a novorozenců. Tyto faktory pak poskytnou lepší pochopení mechanismů vedoucích k předčasnému porodu [96]. Predikce je založena na identifikaci rizikových faktorů, které nevykazují dostatečnou specifitu a senzitivitu. Mezi nejvýznamnější rizikové faktory předčasného porodu se řadí zjištění funkčního zkrácení děložního hrdla (<25 mm) do 30. týdne těhotenství pomocí transvaginálním ultrazvukem a anamnestické údaje o předčasném porodu nebo pozdním potratu ve druhém trimestru těhotenství [90]. Je možné stanovit kvalitativně i kvantitativně fetální fibronektin, placentální alfa mikroglobulin 1 a inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF I) [90].

Také lze stanovit i koncentrace matrixmetalloproteináz 8 a 9 v séru matky. Koncentrace těchto biomarkerů stoupají 24 hodin před zahájením porodu. V prevenci nemá tato pozdní předpověď moc význam, ale pomáhá pochopit patofyziologii předčasného porodu. Avšak obě tyto matrixmetalloproteinázy jsou důležité pro odhalení intrauterinní infekce. Stanovují se z plodové vody pomocí bedside testu, který semikvantitativně vyhodnotí přítomnost sledovaných parametrů [97].

Pro vyšetření se jako zdroj pro identifikaci biologických markerů pro predikci předčasného porodu používá cervikovaginální tekutina, plodová voda, sliny, moč, sérum nebo plazma [98].

Intrauterinní zánět

Před porodem nebo i během něho praskne plodový vak a plodová voda odtéká z těla ven přes vagínu postupně nebo najednou. V tuto chvíli dochází ke zvýšenému riziku vzniku infekce [3].

Hlavní příčinou předčasného porodu je intrauterinní zánět vyvolávající předčasnou rupturu plodových obalů a následně předčasný odtok plodové vody [99]. Intrauterinní zánět je chronický proces, při kterém se aktivuje vrozený IS. Intrauterinní zánět má nepřímou souvislost s gestačním věkem, nachází se u 83 % novorozenců, kteří mají porodní hmotnost nižší než 1000 g při narození, a u 10 % novorozenců s porodní hmotností 2500 g [100]. Intrauterinní zánět postihuje až 30 % všech novorozenců, kteří se narodili před nebo ve 34. týdnu gravidity, zvyšuje se u nich riziko novorozenecké úmrtnosti [101].

Intrauterinní zánět se projevuje histologickými i klinickými příznaky a může být omezen pouze na decidua. Dokáže se rozšířit i do prostoru mezi amniem a chorionem a dostat se až do amniové dutiny a k plodu. Intrauterinní zánět také zahrnuje FIRS neboli systémové zánětlivé poškození plodu. K FIRS může dojít na základě spolknutí bakterií nebo prozánětlivých biomarkerů, které se nacházejí v plodové vodě, a tím dochází k vyvolání zánětlivé reakce plodu - tzv. FIRS [90].

Intrauterinní zánět je často způsoben bakteriální infekcí [100]. Bakterie jsou rozpoznány pomocí receptorů pro rozpoznávání vzorů (PRR). Jedná se o skupinu proteinů rozpoznávající molekulární struktury v mikroorganismech. PRR vážou molekuly (produkty oxidačního stresu) uvolňující z poškozených buněk nebo tkání.

PRR vyvolávají uvolňování zánětlivých chemokinů a cytokinů (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α). Všechny tyto cytokiny spolu s mikrobiálními endotoxiny v intraamniální dutině vedou ke zvýšené produkci prostaglandinů a dalších zánětlivých mediátorů a enzymů, které degradují matrici. Prostaglandiny spolu s pomocnými T-lymfocyty (Th1), TNF α , INF γ a IL-1 stimulují mateřské myometrální buňky ke kontrakci dělohy, indukují zralost děložního hrdla a spolu s degradací extracelulární matrix ve fetálních membránách vedou k předčasnému prasknutí plodových membrán a k PPRM [102]. Důležitou podskupinou PRR jsou TLR, které rozpoznávají různé druhy ligandů (peptidoglykan, flagelin, RNA, lipopolysacharidy) u mikroorganismů.

Dalším významným receptorem PRR je C-reaktivní protein. CRP se řadí mezi krátké pentraxiny a objevuje se v těle jako protein akutní fáze. Hepatocyty produkují CRP ve chvíli, kdy se v těle objevují prozánětlivé cytokiny. CRP aktivuje klasickou cestu komplementu, brání adhezi neutrofilních segmentů na endotelové buňky, a tím ztěžuje migraci do míst vzniku. Dále se podílí na opsonizaci patogenů a indukuje produkci cytokinů v monocytech [103]. V případě, že má lékař podezření na intrauterinní zánět a nelze se spolehnout na leukocytózu, odebere se matce krev a hladina CRP se stanoví z mateřského séra. Lékaři zjistili, že zvýšené hladiny CRP (vyšší než 8 mg/l) až dvojnásobně zvyšují riziko předčasného porodu [103]. Hladina CRP v mateřském séru je bohužel považována za nespecifický biomarker intrauterinního zánětu, a proto není možné jen základě této hodnoty určit, že v těle matky probíhá intrauterinní zánět [104]. Lékaři proto doporučují odebrat plodovou vodu ve druhém trimestru těhotenství a stanovit z ní hladinu CRP. Je-li hladina CRP vyšší než 110 ng/ml, je zde až osminásobně zvýšené riziko předčasného porodu a PPRM. Jelikož je molekulová hmotnost CRP 106 kDa, není možné, aby prošel od matky skrz placentární bariéru. Proto CRP nalezený v plodové vodě pochází od plodu, jehož játra CRP produkují jako odpověď na probíhající zánět. Tento fakt je potvrzen i studiemi, jež nenašly žádné korelace mezi hladinami CRP v plodové vodě a mateřském séru [105]. Dalším významným receptorem je pentraxin 3, ale ten bude popsán až v další kapitole.

Intrauterinní zánět se často může projevit i bez imunitní reakce matky, což lékařům ztěžuje jeho včasné odhalení. Bakterie, které způsobují intrauterinní infekci, mohou kolonizovat plodovou vodu, a to i bez zánětlivé reakce. Klinické projevy intrauterinního zánětu se často projevují až v pozdním stádiu těhotenství,

kdy dochází k pokročilému průběhu zánětu [106,107]. Mezi klinické příznaky patří děložní kontrakce a změny děložního hrdla vedoucí k předčasnému porodu a PPRM. Jednotlivé příznaky intrauterinního zánětu se mohou vzájemně propojovat a cílem lékařů je, aby byl zánět včas odhalen. Intrauterinní zánět se může histologicky projevit zánětem pupečníku (funisitida), plodových obalů (chorioamnitidou) nebo děložní sliznice (deciduitidou) [106].

Biochemicky se intrauterinní zánět může projevit zvýšenou hladinou fetálního plazmatického IL-6, CRP, IL1, IL-2 [98,100]. Zvýšená může být i hladina IL-8, který je zodpovědný za vstup neutrofilů do tkání chorioamnionu a placenty. U pacientek s potvrzenou chorioamnitidou a PPRM je vyšší hladina IL-8 v plodové vodě. Proto je IL-8 považován za biomarker předčasného porodu a PPRM, se používá jako neinvazivní indikátor intrauterinní infekce. Koncentraci IL-8 je možné stanovit nejen z plodové vody, ale i z cervikálního hlenu [108].

Kromě těchto látek se aktivují i monocyty, neutrofilů v chorioamniálních obalech a makrofágy v deciduální tkáni [99]. Tyto fagocytující buňky jsou zdrojem prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF α) v plodové vodě a účastní se zánětlivé odpovědi, jejich hladina stoupá s délkou trvající infekce. IL-1 a TNF α jsou uvolňovány z decidua a fagocytů, stimulují produkci kyseliny arachidonové, aktivují fosfolipázu A2, a díky tomu podporují tvorbu prostaglandinů v myometriu [109].

Dále mohou být zvýšeny hladiny růstového hormonu pro granulocyty, leukocyty a makrofágy (GM-CSF) a TNF α [98]. Současně dochází k aktivaci lymfocytů. Novorozenci s intrauterinní infekcí mají zvýšený počet Th1 a k tomu odpovídající zvýšený INF γ [102].

Diagnostika infekce v amniální tekutině je nespecifická a neefektivní. Skládá se z vyšetření krevního obrazu (včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů) v mateřské krvi a CRP. Proto se může přistoupit i k odběru plodové vody transabdominálně nebo vaginálně [110]. Takto odebraná amniotická tekutina se vyšetřuje mikrobiologicky, stanovuje se koncentrace glukózy a laktátu, aktivity esteráz leukocytů a počet leukocytů. Jedná se o invazivnější vyšetření, které má také poměrně malou specifitu a senzitivitu, proto se od něj v posledních letech ustupuje [111]. V poslední době se stanovuje hladina IL-6, který je těmto vyšetřením nadřazený, z plodové vody pomocí ELISA (enzymová imunisorbentní analýza) metody a jeho hladina pro určení

intrauterinního zánětu je 2600 pg/ml. Stanovení pomocí ELISA metody je pro lékaře velmi neefektivní, a proto se přiklání k bedside testu fungujícího na principu imunochromatografie. Hladina pro určení zánětu je pro IL-6 tímto testem 745 pg/ml [112]. V posledních letech se objevil velmi rychlý test pro stanovení IL-6 z plodové vody. Ten je založen na principu elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy „ECLIA“ a vyhodnocuje se pomocí analyzátoru Cobas E nebo Elycsys®. Test trvá 18 minut a hladina pro určení intrauterinního zánětu v tomto případě je 3000 pg/ml [113].

Dále se diagnostikuje zánět pomocí ultrazvuku. Gynekolog provede ultrazvuk děložního čípku vaginální sondou (cervikometrie). Tím může určit, zda se jedná o zánět plodových membrán, vody, placenty, nebo jestli se nejedná o prostou kolonizaci. Kvalitativní i kvantitativní změny děložního hrdla jsou spojeny s přítomností mikroorganismů a jsou označovány jako cervikální insuficience. Intrauterinní infekce je pak popisována až u 80 % pacientek s akutní cervikální insuficiencí [114]. Intrauterinní zánět lze diagnostikovat i pomocí kardiokografie, která dokáže rozpoznat přítomnou infekci v případě, že má plod tachykardii [115].

Nejzávažnějším a nejpokročilejším stádiem ascendentního intrauterinního zánětu je infekce plodu. Carroll a spol. [116] uvedli, že fetální bakteriémie je přítomna u 33 % plodů s pozitivní kultivací plodové vody. V jiné studii byly z pupečnickové krve novorozenců narozených před 32. týdnem detekovány genitální mykoplazmata u 23 % testovaných [117]. Invaze mikroorganismů do děložní dutiny je často spojována s intrauterinním zánětem a zánětlivou odpovědí plodu. Tato reakce se spojuje s předčasným porodem, poškozením plodu a dlouhodobými hendikepy (periventrikulární leukomalacie, chronické onemocnění, dětská mozková obrna, intraventrikulární hemoragie III. a IV. stupně, nekrotizující enterokolitida, myokardiální dysfunkce, neonatální sepsi) [107].

Mikroorganismy v plodové vodě

Na počátku vývoje kojence hrají mikrobiální společenství důležitou roli tím, že ovlivňují funkce IS. Vzhledem k tomu, že faktory ovlivňující složení střevní mikroflóry kojence mají terapeutický a prognostický význam, začal v posledních letech zájem o jejich pochopení. Vědci chtějí porozumět, jaký dopad má mikrobiální

interakce v intrauterinním životě na zdraví plodu i matky, proto se zvedl zájem vědců o to, zda nejsou v plodové vodě nějaká mikrobiální společenství [118].

Intrauterinní zánět je často způsoben přítomností bakteriální infekce, ke které dochází při výstupu bakterií z porodních cest přes cervikální kanál až k plodovým membránám do plodové vody a v nejzávažnějších případech až do fetální krve. K invazi bakterií může dojít i během neúmyslného přenosu patogenu do amniové dutiny během aminocentézy [100]. Další možností, jak se mohou bakterie dostat do plodových membrán, je přesun z matčiny krve přes placentu. Zatím není přesně objasněno, kdy se bakterie do dělohy dostanou, ale vědci se domnívají, že průnik bakterií do dělohy nastává až ve druhém trimestru těhotenství [119].

Někdy se mohou dostat bakterie do dělohy při bakteriální vaginóze. U bakteriální vaginózy se mění fyziologický mikrobiální biofilm (laktobacily) za gramnegativní anaerobní bakterie [120]. Klinicky se projevuje vaginálním pH vyšší než 4,5, bílým výtokem a rybím zápachem při výtoku z pochvy. Bakteriální vaginóza je v laboratoři definována na základě Gram-stain Nugentova skóre nebo dle Amselových parametrů [120]. Dle Gram-stain Nugentova skóre se hodnotí počet laktobacilů, kterých je málo, a přítomnost gramnegativních anaerobních bakterií, jejichž počet je vysoký [121]. Je-li skóre 7-10, jedná se o bakteriální vaginózu a její pozitivní nález je jedním z markerů intrauterinní infekce u asymptomatických žen. Přítomnost bakteriální vaginózy během těhotenství je často spojována s 2x a 3x vyšším rizikem vzniku předčasného porodu. Mechanismus, jakým je s předčasným porodem spjata, zatím není zcela znám. Předpokládá se, že bakterie způsobující intrauterinní infekci vstupují do dělohy před nebo krátce během těhotenství [121].

Mikrobiologické studie ukazují, že intrauterinní zánět může představovat až 25-40 % předčasných porodů. Ovšem to je pouze minimální odhad, protože průkaz intrauterinní infekce běžnými kultivačními technikami je velmi obtížný a nelze pouze na jeho základě rozpoznat intrauterinní infekci [122]. Nejčastěji se provádí aerobní a anaerobní kultivace plodové vody spolu s kultivací na mykoplazmata. Jedná se o nejlevnější metodu, u které se dlouho čeká na výsledky a nedokáže identifikovat i přítomnost těžce kultivovaných bakterií nacházejících se v plodové vodě [123]. Proto se v posledních letech k potvrzení nebo vyloučení intrauterinní infekce používá polymerázová řetězová reakce (PCR) pro genitální mykoplazmata nebo stanovení

bakteriální DNA (deoxyribonukleová kyselina) v plodové vodě s následnou sekvenací spolu s kultivačními technikami [106]. PCR metody dokážou stanovit i množství dané bakterie v plodové vodě, a to buď jako absolutní množství, nebo využitím hodnoty threshold cyklu (CT) jako jednoduché relativní kvantifikační techniky. Hodnota CT stanovuje počet amplifikačních cyklů, jenž jsou potřebné pro překročení prahové hodnoty. Zjednodušeně lze říct, že čím více je v plodové vodě přítomných bakterií, tím nižší je hodnota CT, platí to i obráceně [124]. Stanovení bakteriální DNA v plodové vodě s následnou sekvenací je jedna z nejlepších technik pro určení intrauterinního zánětu. Vyšetřuje se bakteriální 16s ribozomální DNA. Tato metoda nedokáže tak dobře a specificky určit genitální mykoplazmata, na rozdíl od PCR metody, která je pro ně více specifická. Avšak toto stanovení dokáže stanovit i bakterie v plodové vodě, které už nemají dostatečný klinický smysl [124].

Díky PCR metodám byly odhaleny nejčastěji se vyskytující bakterie v plodové vodě u žen s předčasným porodem. Jednalo se především o bakterie *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus mitis*, *Chlamydia trachomatis* a *Fusobacterium nucleatum* [125]. Ovšem bylo identifikováno i mnoho dalších bakterií. Některé běžně se vyskytující bakterie v genitálním traktu (*Streptococcus agalactiae*) byly identifikovány spíše vzácně, a to ještě před prasknutím membrány [122]. Některá genitální mykoplazmata identifikovaná v děloze mají nízkou virulenci a pravděpodobně zodpovídají za chronické intrauterinní záněty a často chybějící klinické příznaky infekce [122].

Zatím není zcela jasné, zda jsou genitální infekce kauzálně spojeny s předčasným porodem. Například trichomoniáza je spojena s předčasným porodem s relativním rizikem 1:3 [126]. Infekce mimo genitální trakt (bakteriurie bez příznaků, pneumonie, apendicitida, pyelonefritida) mohou mít také souvislost s předčasným porodem.

Fluorescenční *in situ* hybridizace s DNA sondou specifickou pro konzervované oblasti bakteriální DNA detekovala bakterie v membráně až u 70 % žen. Tento objev naznačuje, že samotná přítomnost bakterií v membráně nedokáže vyvolat zánětlivou reakci, předčasný porod ani PPRM [127].

V roce 2016 Collado a spol. [128] zveřejnili studii, že pomocí sekvenace nové generace lze detekovat bakteriální sekvenace v plodové vodě u 15 zdravých těhotných

žen. Nejčastěji detekovanými bakteriemi byly bakterie rodu *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Propionibacterium*. Tyto životaschopné bakterie byly detekovány v placentě, pupečnickové krvi nebo v mekoniu.

Efrem S. Lim [129] se se svým kolektivem zabývali možnostmi identifikovat populaci bakterií pomocí qRT-PCR v plodové vodě od zdravých těhotných žen. Vzorky plodové vody byly porovnávány s negativními kontrolami lišícími se v koncentraci a obsahu amplifikovaných sekvenací. Z výsledků vyplývá, že nenašli žádné rozdíly a že plodová voda zdravé těhotné ženy obsahuje velmi malé množství bakteriální komunity.

Ve srovnání s bakteriemi způsobující předčasný porod se toho o virech ví méně. Některé virové infekce mohou mít predispozici k předčasnému porodu, ale pouze v případě, je-li matka těžce nemocná (varicelová pneumonie, akutní respirační syndrom) [130]. Cytomegalovirus, HIV (Human Immunodeficiency Virus), virus chřipky, zarděnek, Zika virus, lidský papilomavirus nebo enteroviry jsou specifické viry, které jsou přenášeny vaginálně nebo transplacentárně na plod. Pomocí metody PCR ve spojení s hmotnostní spektrometrií mohly být některé viry (cytomegalovirus, adenovirus, virus herpes simplex, enteroviry nebo virus Epstein-Barrové) rozpoznány u asymptomatických žen [131]. Plodová voda byla geneticky vyšetřena a výsledky prokázaly přítomnost virů obecně nesouvisí s následnými předčasnými porody. Přítomné viry dokážou koexistovat s plodem, aniž by mu způsobovaly nějaké potíže. Proto se také zdá nepravděpodobné, že mateřská virová infekce hraje důležitou roli v předčasném porodu [132].

1.2.6 Předčasný odtok plodové vody

Předčasný odtok plodové (PROM) vody patří do skupiny spontánních předčasných porodů. PROM komplikuje 4-7 % všech porodů a ve 30-40 % dochází po předčasném odtoku plodové vody k předčasnému porodu [133]. Předčasný odtok plodové vody se dělí na předčasný odtok plodové vody pozdní, ten se vyskytuje u těhotenství, které trvá déle než 37. týdnů (v gestační stáří 34+0 až 36+6 týdnů), a předčasný odtok plodové vody před termínem neboli časný (PPROM). PPRM se objevuje v těhotenství, jež je ukončeno před 37. týdnem (gestační stáří 24+0 až 33+6 týdnů) [134].

U PPROM je narušena integrita plodových membrán s odtokem během hodiny [134]. PPROM může mít souvislost se vzestupem mateřské i perinatální nemocnosti, ale i s nízkým gestačním stářím plodu [133]. PPROM je jeden z nejzávažnějších druhů předčasného porodu [107]. Ze strany managementu je PPROM nevratný proces, na rozdíl od předčasného porodu s kontrakcemi a intaktními plodovými membránami.

R. Menon [135] popsal předčasný odtok amniové tekutiny jako endogenní infekční onemocnění, u kterého je zánětlivá odpověď hostitele odpovědná za aktivaci kolagen specifických matrix metaloproteináz. Tyto metaloproteinázy pak zapříčiní degradaci extracelulární matrix a následně dochází k PPROM.

PPROM je multifaktoriální proces, u kterého ale zatím není objasněna jeho přesná patofyziologie [134]. PPROM může vyvolat mikroorganismy indukovaný intrauterinní zánět, infekce v choriodecuiálním prostoru, nadměrné rozpětí plodových membrán, senescence nebo apoptóza buněk plodových membrán [133].

Byly sestaveny rizikové faktory, již mohou mít souvislost s PPROM. Jedná se o rizikové faktory dělohy a placenty, mezi které se řadí: cervikální inkompetence, anomálie dělohy, abrupce (utržení) placenty, konizace, fetální růstová restrikce, mikroorganismy indukovaný intrauterinní zánět nebo nadměrná distenze dělohy [136]. Druhou skupinou rizikových faktorů jsou faktory plodu: vícečetné těhotenství. Poslední skupinu rizikových faktorů tvoří rizikové faktory těhotné matky: onemocnění pojivové tkáně, chronická léčba kortikosteroidy, krvácení v průběhu těhotenství, PPROM v předchozí graviditě, předčasný porod v minulém těhotenství, nízký body mass index, kouření, stres, užívání drog (především kokainu) a nízký sociálně ekonomický status matky [134].

PPROM je často způsoben mikrobiální infekcí nebo intrauterinním zánětem [137]. Obě příčiny komplikují 30-35 % všech PPROM a obě mohou způsobit vznik sepse, intraventrikulární hemoragie nebo pneumonie [137]. Hlavním cílem lékařů je včas odhalit intrauterinní infekce při přijímání pacientky na porodní sál. U intrauterinního zánětu se často nevyskytují klinické příznaky (tachykardie matky i plodu, zvýšený tonus dělohy, horečka, mekoniem zakalená páchnoucí plodová voda, jež odtéká), proto je velmi těžké u těchto pacientek intrauterinní infekci s PPROM poznat [138]. Diagnostika se dělá stejně jako u intrauterinního zánětu. Jakmile je potvrzena diagnóza, jsou pacientce s PPROM podána antibiotika, která prodlužují

délku latence a snižují riziko vzniku bronchopulmonální dysplazie, spotřebu podávání surfaktantu nezralému novorozenci, pozitivní kultivaci v krvi novorozenců. Díky antibiotikům také redukuje výskyt histologické chorioamnionitidy a sonografických abnormalit na mozku. Studie Flenadyho a Kinga [139] z roku 2002 se zajímala o užívání antibiotik u těhotných žen s hrozícím nebo probíhajícím PPRM bez příznaků klinické infekce. Jejich studie došla k závěru, že běžné podávání antibiotik nezlepšuje prognózu předčasně narozených novorozenců a v dlouhodobém pozorování (7 let) může u těchto dětí dojít k nejrůznějším funkčním poruchám. V krátkodobém sledování můžeme očekávat, že podání antibiotik bude mít význam pro těhotnou matku, protože dojde ke snížení incidence puerperální endometritidy [140]. Bohužel stále se opakující užívání antibiotik může vést ke zvýšenému riziku vzniku rezistentních novorozeneckých sepsí.

Multicentrická a randomizovaná studie ORACLE I, hodnotila užívání antibiotik ve vztahu k mortalitě pacientek s PPRM a k neonatální morbiditě. Protokoly o užívání antibiotik se liší v závislosti na geografických rozdílech. Avšak vždy jde o to, že antibiotika jsou podávána na základě kultivace bakterie v plodové vodě [107,140]. Jako dobré antibiotikum se ukázal erytromycin, protože většina intrauterinních zánětů je způsobena genitálními mykoplazmaty. Erytromycin prodlužuje těhotenství a u jeho podávání dochází k redukci léčení novorozenců surfaktantem, ke snížení výskytu novorozeneckých infekcí (snížené pozitivní hemokultury) a ke snížení podávání kyslíku po 28. dnu života [140]. Erytromycin v České republice není dostupný pro intravenózní podání, a proto se přešlo na makrolidová antibiotika [113], která jsou nejúčinnější v případě nasazení před 30. týdnem těhotenství a patří mezi bakteriostatická antibiotika a většinou jsou užívána parenterálně. Při opakovaných zánětech je zvýšené riziko vzniku antibiotické rezistence. Makrolidy mají významný účinek pro matku než pro plod [140]. V České republice se nejčastěji nasazoval azitromycin, ale v současné době je na něj většina bakterií rezistentní, proto se pacientkám podává claritromycin. Avšak každá pacientka s infekcí a PPRM je individuální případ a musí se k ní i tak přistupovat [140].

Při symptomatickém PPRM se podávají dva druhy antibiotik (ampicilin a gentamycin parenterálně). V případě, že má pacientka alergii na penicilin, podávají se jí dvě jiná makrolidová antibiotika (klindamycin a gentamycin, azitromycin a gentamycin) [140].

V závislosti na délce těhotenství jsou dvě možné cesty léčby pacientky – expektační (vyčkávací) a aktivní. Vyčkávací cesta se používá u PPRM před ukončeným 28. týdnem těhotenství, kdy je limitující zralost plic plodu. Pacientce se podají antibiotika a dynamicky se pozorují biomarkery intrauterinního zánětu, kontroluje se množství plodové vody, pohyby plodu a jeho dýchání pomocí ultrazvuku. Jestliže laboratorní výsledky a klinické příznaky neukazují na aktivní zánět matky nebo na zánětlivou reakci plodu, pokračuje se v těhotenství i po vysazení antibiotik. Antibiotika jsou matce podávána 5-8 dní, ale v případě, že to klinický stav matky dovolí, jsou podávána až do doby, než lékař rozhodne o ukončení těhotenství [107]. K aktivní cestě léčby se přistupuje ve chvíli, kdy je dokončen 28. týden těhotenství. Ta je založena na předpokladu, že je dokončen vývoj plic a při plánování porodu je dosaženo nízké perinatální morbidity a mortality. Pacientce jsou podávána antibiotika a kortikosteroidy [107]. Kortikosteroidy redukuje riziko vzniku syndromu dechové tísně novorozence, nekrotizující enterokolitidy, intraventrikulárního krvácení a riziko smrti dítěte.

Management pacientek s PPRM

U managementu PPRM je velmi důležité nejprve vyloučit příznaky hypoxie plodu a klinickou chorioamnionitidu, která se může projevit horečkou a tachykardií u matky (nad 100 tepů/minutu) nebo tachykardií u plodu (nad 160 tepů/minutu). Dále se může projevit citlivostí dělohy, bolestí břicha, hnisavým vaginálním výtokem nebo závažným krvácením, laboratorně se projeví leukocytózou (vyšší než $15 \times 10^9/l$) a náhle zvýšenou hladinou CRP [113].

Management pacientek s PPRM se dělí na management časně PPRM a pozdní PPRM. U časně PPRM je hlavní kontraindikací přítomnost intrauterinní infekce a její pozdější následky. Tato infekce zvyšuje riziko vzniku časně novorozenecké sepse, a proto se v určitých případech u pacientek s časnou PPRM přistupuje ke konzervativnímu přístupu léčby [141]. Profesor Kacerovský [123] se domnívá, že by mohl odhalit tyto pacientky odběrem vzorku plodové vody, který by analyzoval. Jakmile dojde k dokončení indukce zralosti plic, je možné u těchto pacientek zahájit porod nebo provést císařský řez. V případě nemožnosti vyšetřit plodovou vodu se volí konzervativní přístup. K indukci plicní zralosti se přistupuje

v případě, že nejsou pozorovány příznaky zánětu choriových klků, hypoxie nebo abrupce placenty. K indukci se přistupuje vždy, i když byly zpozorovány známky zánětu v plodové vodě. Při konzervativním přístupu se nemusíme obávat přítomnosti betahemolytických streptokoků v pochvě, protože se nejedná o kontraindikaci. Postup je stejný jako u pacientek bez těchto bakterií, rozdíl je pouze v případě porodu, kdy jsou podávána antibiotika [123].

Pozdní PPRM je obecně jednodušší a méně závažný než časný PPRM, protože zde je vyšší gestační věk. Bohužel je v tomto případě těžší stanovit optimální management, který by byl méně kontroverznější a komplikovanější. Novorozenci, kteří pocházejí z pozdní PPRM mají vyšší riziko morbidit než ti, kteří jsou narozeni po dokončeném 39. týdnu gravidity. U pozdní PPRM se vědci neshodují, zda je lepší management konzervativní či aktivní. Studie provedené nizozemskými vědci na toto téma neukázaly žádné velké rozdíly v neonatální morbiditě [141,142]. Ve srovnání s konzervativním přístupem byl aktivní management spojen s nižším výskytem neurologických komplikací u dětí do 2 let, ale nelepšil krátkodobé výsledky novorozenců. Profesor Kacerovský [123] ve své studii uvádí, že u 12 % pacientek zjistil zánět v plodové vodě, ale u jedné čtvrtiny pacientek došlo k rozvinutí novorozenecké sepse. U 14 % pacientek bylo odhaleno závažné respirační onemocnění. V tomto případě prof. Kacerovský tvrdí, že je velmi důležité co nejdříve rozpoznat pozdní PPRM, než postupovat konzervativně [123].

U managementu PPRM je velmi důležitá individualita pro každou pacientku, protože neonatální výsledky jsou potom mnohem lepší. Intrauterinní zánět je spojován s větší a intenzivnější zánětlivou odpovědí plodu a s vyšší incidencí FIRS. U pacientek s aktivním managementem PPRM, mají novorozenci lepší neonatální morbiditu. Naopak u pacientek, u kterých se přistupuje ke konzervativnějšímu managementu, je expozice plodů na intrauterinní zánět delší, a proto mají tyto novorozenci horší neonatální morbiditu [143].

Diagnostika předčasného odtoku plodové vody

Jestliže má v České republice lékař podezření na PPRM, musí být pacientka ihned hospitalizována. Ve světě se k PPRM lékaři přistupují trochu jinak a pacientky se snaží sledovat a léčit i ambulantně. Podle gestačního stáří se pacientka hospitalizuje

na perinatologické centrum intermediární nebo intenzivní péče [113]. Vstupním vyšetřením je ultrazvuk, kterým se hodnotí hmotnost plodu, objem plodové vody, umístění placenty a určuje se poloha plodu. Dále jsou odebrány vzorky pro biochemická, hematologická a mikrobiologická vyšetření. Po celou dobu hospitalizace je potřeba sledovat teplotu, tlak a pulz matky i plodu a dodělat všechna nezbytná kardiokografická vyšetření [107,115].

Dále je u rodiček s podezřením na PPRM důležité sledovat anamnestické údaje o odtoku amniové tekutiny. Ten je prokázán při vyšetření v zrcadlech [134]. Gynekolog může použít k vyšetření Temašváryho zkoušku na průkaz plodové vody v pochvě. Tento test má vysokou senzitivitu a nízkou falešnou pozitivitu při kontaminaci krve, spermatem či močí [144]. Zkouška s Temašváryho činidlem je založena na změně barvy bromtymolu při změně pH. Vlivem odtoku plodové vody se změní pH pochvy z kyselého na zásadité a změní se barva bromtymolu z oranžové na modrou [145].

Ferningův test se také používá k potvrzení PPRM. Při tomto testu se sterilním vatovým tampónem udělá stěr v oblasti děložního čípku a následně tenký nátěr na podložní sklíčko. Lékař prohlíží vzorek pod mikroskopem při celkovém zvětšení 40x až 100x a hledá krystalizaci plodové vody, která se projeví obrazcem připomínající list kapradí [146].

Dalším test je nitrazinový, u kterého se používá sterilní vatový tampón napuštěný nitrazinovým činidlem o žluté barvě. Sterilní vatový tampón se zavede do oblasti kolem děložního čípku a jestliže dojde ke změně barvy (zmodrá), lékař může brát změnu barvy jako pozitivní nález PPRM. Nevýhodou testu je ovlivnění přítomnosti moče, spermatu nebo krví [146].

Další možností je využití i více specifických testů, jako jsou testy prokazující přítomnost IGF-I (Actim-PROM™ test) a placentárního amikroglobulinu 1 (Amnisure test).

1.3 Biomarkery intrauterinního zánětu

Dle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jsou biomarkery objektivně měřitelné látky používající se jako indikátory fyziologického a patologického procesu

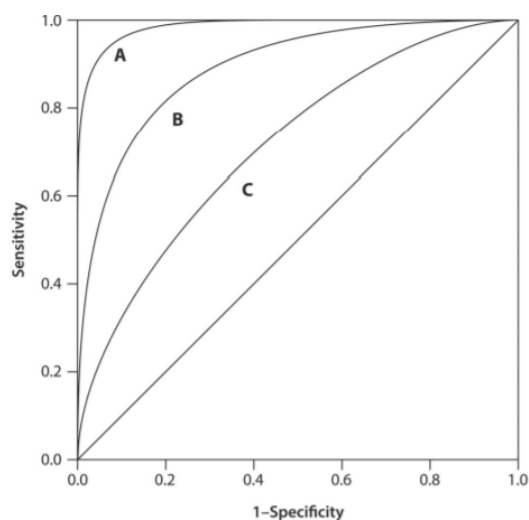
nebo reakci na farmakologickou terapii. Biomarker je většinou proteinová molekula, jejíž přítomnost lze určit pomocí specifických monoklonálních protilátek. Jedná se o molekuly nacházející se v tkáních nebo tekutinách lidského těla [147].

Vědci a lékaři sestavili ideální vlastnosti biomarkerů. Mezi tyto vlastnosti se řadí vysoká tkáňová nebo orgánová specifita, vysoká míra citlivosti a specifita k určitému onemocnění. Důležitou roli hraje stanovení cut-off hodnoty a přijatelná dynamika v čase. Významný parametr je i vztah mezi laboratorní hodnotou a rozsahem poškození organismu nebo tkáně [147].

Lékaři používají biomarkery pro diagnostiku různých onemocnění, pro určení rozsahu daného onemocnění nebo prognózy nemoci. Dále mohou být použity pro monitorování průběhu onemocnění a účinnosti terapie [147]. Biomarkery jsou látky s různými chemickými vlastnostmi a většinou se řadí mezi bílkoviny (peptidy), hormony, enzymy, metabolity nebo nukleové kyseliny. Na základě jejich složení a struktury lze určit způsob, kterým budou biomarkery testovány [148].

ROC křivka

Každý biomarker lze charakterizovat pomocí jeho senzitivity a specifity k danému onemocnění. Senzitivita nám ukazuje, jaká je možnost, že u pacienta s pozitivním nálezem objeví dané onemocnění. Naproti tomu specifita nám určuje pravděpodobnost negativního výsledku u zdravého člověka (bez pozitivního nálezu) [149]. Pro hodnocení těchto parametrů, byla zavedena tzv. ROC křivka (Receiver Operating Characteristic) a určena tzv. AUC (plocha pod křivkou) (Obrázek 4).



Obrázek 4: Teoretická ROC křivka s tzv. AUC, definující diagnostickou přesnost, která se zlepšuje ve směru od křivky C ke křivce A, převzato [150]

Obrázek znázorňuje AUC, která se blíží k hodnotě 1, označuje ideální diagnostický test. Kdežto AUC blíží se k diagonále ($AUC=0,5$) nemá žádné diagnostické využití v klinické praxi. V jednom grafu se může najednou objevit i více ROC křivek [151]. ROC křivka blíží se levému hornímu rohu s největším AUC poukazuje na vhodné použití testu pro diagnostiku daného onemocnění. Je-li však ROC křivka blíže diagonále, dostáváme pouze negativní nebo pozitivní výsledky nesouvisející se skutečným stavem onemocnění. Při stanovení více biomarkerů najednou se tvar ROC křivky mění a je zde vyšší pravděpodobnost senzitivity a specifity, vyšetření nám eliminuje falešně negativní i falešně pozitivní výsledky. AUC shrnuje celé umístění křivky a je účinným a kombinovaným měřítkem senzitivity a specifity popisující vlastní validitu diagnostických testů [152].

1.3.1 Průkaz biomarkerů

Imunoanalytické metody se staly, díky velmi specifické reaktivitě mezi cílovým biomarkerem (antigenem) a jeho specifickou protilátkou, nejpoužívanějšími metodami pro detekci biomarkerů v klinické praxi. Díky jedinečné biospecifické reakci, která využívá nekovalentní vazby, je možné prokázat molekuly biomarkerů i ve velmi heterogenních tělních tekutinách s velkou spoustou látek s rozdílnou chemickou povahou. Přítomnost kvantifikace molekul biomarkerů lze stanovit i bez předchozí úpravy vzorků [150]. Imunoanalytické testy se řadí mezi screeningové testy fungující

na principu vazebné síly mezi antigenem (biomarkerem) a specifickou protilátkou [153]. Výhodou těchto testů je, že jsou přístrojově i cenově nenáročné, rychlé, nevyžadují vysoké náklady na reagenty, spotřebovávají malé množství vzorku a jsou jednoduché na vyhodnocení. Také jsou velmi citlivé a podají lékařům užitečné informace o výskytu nebo množství biomarkerů v hledané tělní tekutině nebo tkáni. Stanovení biomarkerů současně při jedné analýze je další výhodou pro některé druhy imunosenzorů [150].

Cílem lékařů je, aby bylo možné stanovit biomarkery v řádech pg/ml nebo ng/ml. K tomu jim pomáhají imunotesty, které jsou založené na afinitním rozpoznání cílového analytu (biomarkeru) mezi dvěma specifickými protilátkami. První specifická protilátka se používá pro záchyt biomarkerů, druhá (konjugovaná s molekulou, jež vydává signál) funguje jako detekční činidlo [150]. Často se značí enzymem, radionuklidem, fluoroforem nebo chemiluminiscenčně. Mohou se také využít nanomateriály nebo jejich kombinace s výše zmíněnými značkami. Využití nanomateriálů poskytuje řadu různých modifikací používající se v oblasti imunosenzorů [154].

Vyhodnocení imunotestů se provádí v závislosti na použitém indikátoru, značce, kterou je sekundární protilátka kovalentně vázána. Například když sekundární protilátku označíme enzymem, pro vyhodnocení se použije spektrofotometrická detekce [147]. V případě, že je sekundární protilátka značena radionuklidem, pro vyhodnocení se použije scintilační detektor [150].

Pro průkaz a identifikaci biomarkerů se v současnosti používá hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF-MS). Principem MALDI-TOF-MS je rozdělení nabitých částic podle jejich molekulové hmotnosti v magnetickém nebo elektrickém poli. K rozpadu a ionizaci vzorku dojde pomocí LASERu. Silným elektrickým (magnetickým) polem jsou ionizované molekuly přeneseny do vakua průletového analyzátoru. V tomto analyzátoru se pohybují na základě svého náboje a hmotnosti, je zde měřena doba letu částice, ze které se pak vypočítá poměr molekulové hmotnosti a náboje částice [147].

1.3.2 Význam biomarkerů v managementu předčasného porodu

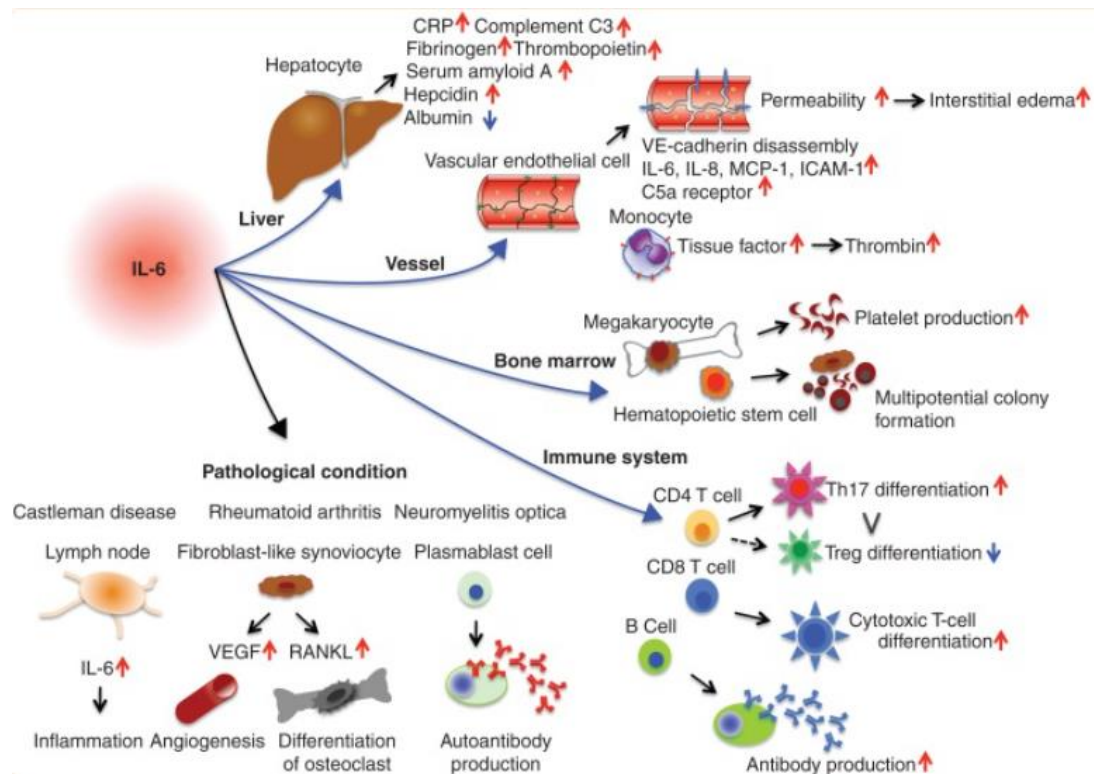
Biomarkery můžeme prokazovat z různých biologických materiálů, jejich stanovení dokáže oddálit nebo úplně zabránit tomu, aby došlo k předčasnému porodu [66]. Nejčastěji jsou biomarkery hledány v séru či plazmě těhotných žen, ale mohou být i v plodové vodě, vaginálním hlenu, moči nebo v tkáních děložního hrdla [155]. Hledání biomarkerů v tkáních děložního hrdla je komplikovanější, ale jedná o se přesnější a přímější cestu průkazu.

Biomarkery, stanovené z těchto biologických materiálů poskytují gynekologům informace o patologických změnách, které by mohly vést k předčasnému porodu [155]. Stále jsou hledány nové biomarkery, které by mohly odhalit lépe a včas riziko předčasného porodu.

1.3.3 Přehled nejvýznamnějších biomarkerů předčasného porodu

Interleukin 6

Interleukin 6 je cytokin, který je považován za mediátora zánětu a účastní se patogeneze různých onemocnění. IL-6 je glykoprotein o molekulové hmotnosti 21,28 kDa. V současné době je to rodina osmi cytokinů, která se stále rozšiřuje [156]. IL-6 se účastní mnoha fyziologických funkcí v lidském těle, dokáže stimulovat B-lymfocyty, aby tvořily protilátky, a indukuje proteiny akutní fáze v játrech (C3, CRP, fibrinogen, trombopoetin, haptoglobin, α 1-antichymotrypsin, sérový amyloid A). IL-6 je prototypový cytokin s pleiotropním účinkem na hematopoézu, zánět a imunitní odpověď [157]. IL-6 je životně důležitý mediátor reakcí akutní fáze (Obrázek 5).



Obrázek 5: Pleotropní účinek interleukinu 6, převzato z [158]

IL-6 je produkován monocyty, makrofágy, endometriální stromatální buňky, trofoblasty nebo fibroblasty. IL-6 je složen ze 4 α helixů [159], byl popsán jako hlavní spojník mezi předčasným porodem a biomarkery a byl objeven ve vysoké koncentraci u pacientů s MSAF a byl popsán jako první známka intrauterinního zánětu. Ze všech vyšetřovaných biomarkerů má nejvyšší senzitivitu a specifitu a přispívá k rozvoji intrauterinního zánětu a následně i k předčasnému porodu [160]. Jeho zvýšené hladiny ve fetální krvi korelují se zvýšeným rizikem vzniku závažných postižení plodu.

Pomocí ELISA metody lze IL-6 stanovit z plodové vody, ale až od druhého trimestru těhotenství [161]. Koncentrace tohoto biomarkeru lze stanovit i z cervikálního stěru nebo vaginálního sekretu [162].

Proteiny teplotního šoku

Proteiny teplotního šoku neboli Heat shock proteiny (HSPs) jsou biomarkery vyskytující se v jádře, mitochondriích, cytoplazmě a endoplazmatickém retikulu všech prokaryotických i eukaryotických buněk. Byly objeveny v 70. letech minulého století

[163]. Jedná se mimo jiné o intracelulární chaperony regulující intracelulární pochody, které udržují homeostázu v průběhu buněčné proliferace a diferenciaci. Chaperony jsou unikátní proteiny pomáhající poskládat polypeptidový řetězec do funkční konformace proteinů [164]. Při ischemii, vysoké horečce, hypoxii tkání, zánětu nebo při autoimunitních onemocnění, tzv. stresových situacích, dochází ke zvýšení intracelulární exprese těchto proteinů [165] v důsledku vyšších nároků buněk na syntézu proteinů.

HSPs se účastní obou imunitních odpovědí, nespecifické i specifické. V případě, že se objeví v extracelulárním prostředí, je to důkaz toho, že v lidském těle se nachází tkáňové poškození nebo nebezpečné signály [166]. HSPs se do extracelulárního prostoru uvolňují z nekrotické buňky nebo tkáně, aktivují tak monocyty pomocí receptorů CD14 nebo CD40. Tento způsob uvolnění HSPs je pasivní, ale HSPs se mohou uvolňovat i aktivně ze živých buněk, např. mononukleární buňky uvolňují HSPs exocytózou [167]. Díky inhibici kaspáz, které jsou součástí cysteinových proteáz, jež se účastní programované buněčné smrti, mají HSPs antiapoptickou aktivitu. HSPs hrají určitou roli i ve zpracování antigenu nebo antigen prezentujících buněk. Z toho vyplývá, že dokážou ovlivnit specifickou odpověď IS, která je zajištěna T-lymfocyty [168].

HSPs můžeme dělit do několika skupin dle jejich molekulových hmotností. Nejznámějším proteinem z této skupiny je Protein teplotního šoku 70 (HSP70), který kóduje 17 genů nacházejících se na různých chromozomech. Molekulová hmotnost HSP70 se pohybuje v rozmezí od 68 do 73 kDa [169]. Po endotoxické stimulaci dochází k makrofázích a v monocitech ke zvýšené expresi HSP70, což vede k potlačení produkce TNF α [170].

HSPs lze stanovit z plodové vody pomocí ELISA metody. U předčasně rodících pacientek i u pacientek rodících v termínu nedošlo k výrazným rozdílům v hladinách HSP70. Když ale Kacerovský a spol. [171] porovnali plodovou vodu pacientek ve druhém trimestru těhotenství (s porodem v termínu), s plodovou vodou pacientek s předčasným porodem bez a s intraamniální infekcí, zjistili, že se zvýšená koncentrace HSP70 objevila u pacientek s intraamniální infekcí a u pacientek s porodem v termínu [171]. Také byla prokázána zvýšená koncentrace HSP70 i u pacientek s preeklampsií [172].

HSP70 antigen se nachází v amniální dutině. V případě patologického procesu začnou se proti tomu to antigenu tvořit autoprotilátky třídy IgG. Tyto protilátky se dostávají přes placentu k antigenu a začínají s ním reagovat. Nově vzniklý imunokomplex aktivuje intraamniální imunitu, proto se imunokomplex může objevit i v placentách předčasně narozených dětí [173].

S těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A

S těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A (PAPP-A) je enzym metaloproteináza, jenž je závislý na zinku a jeho molekulová hmotnost je 20,5 kDa [174]. Jedná se o vysokomolekulární glykoprotein, který je produkován během těhotenství placentou a buňkami syncytiotrofoblastu ve formě dimerického tetrameru. Z placenty se pak následně dostává do krevního řečiště matky [175]. Syntéza PAPP-A byla prokázána už v 7. týdnu těhotenství a pokračuje až do porodu, kdy jeho hladiny rychle klesají. [175]. PAPP-A se během těhotenství aktivně zapojuje do růstového procesu, procesu diferenciacce a reparace. PAPP-A štěpí IGF-1, který je důležitý pro správný vývoj plodu [175]. Po jeho odštěpení vznikají volné IGF-1, které jsou důležité v místních proliferačních reakcích.

PAPP-A se řadí mezi biomarkery a jeho nízké hladiny poukazují na pozdější vývoj PE [174] a riziko vzniku předčasného porodu [175]. Samotný PAPP-A ale není vhodné stanovovat, protože jeho diagnostická účinnost pro určení preeklampsie není dostatečná. Je potřeba, aby stanovení PAPP-A bylo doplněno o vyšetření Dopplerovskou ultrasonografií děložní tepny, tzv. o pulsní index a o stanovení mateřských a biochemických faktorů. Tím je dosaženo vyšší míry detekce preeklampsie [174,175].

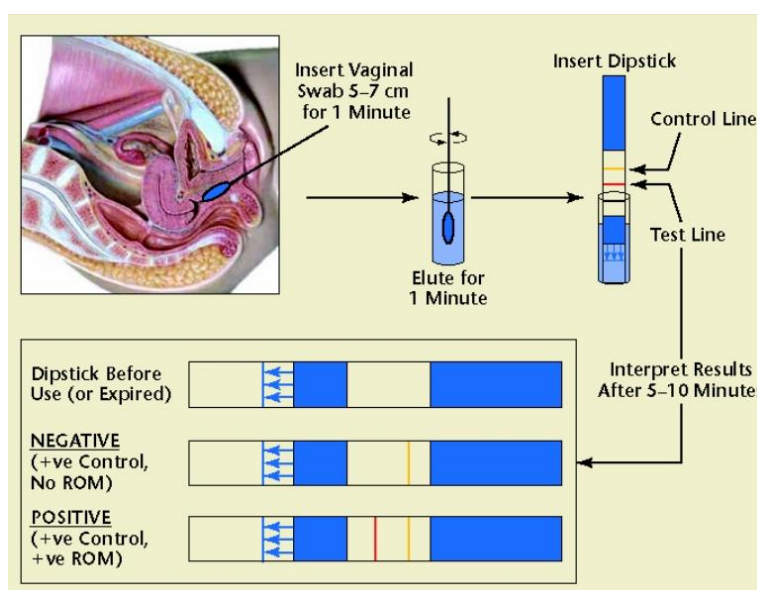
Placentární α -mikroglobulin-1

Placentární α -mikroglobulin-1 (PAMG-1) je glykoprotein o molekulové hmotnosti 34 kDa. PAMG-1 se nachází v plodové vodě, kde je jeho množství 2000-25 000 ng/ml, proto je používán jako biomarker předčasné ruptury plodových membrán a předčasného porodu [176,177]. V krvi matky se také nachází, ale jeho koncentrace je zde podstatně nižší (5–25 ng/ml). PAMG-1 se také objevuje v cervikovaginální sekretu, zde je jeho koncentrace nejnižší (0,05–0,2 ng/ml) [176].

V případě, že dojde v těle matky k vaginálnímu zánětu, zvýší se koncentrace PAMG-1 na 3 ng/ml. Tato koncentrace se zvyšuje s probíhajícím zánětem, a to velmi rychle. Zvyšující se koncentrace PAMG-1 v cervikovaginálním sekretu je důkazem toho, že došlo k předčasné ruptuře plodových membrán [177].

Díky tomu, že koncentrace PAMG-1 je tak vysoká v plodové vodě, je možné ho prokázat během 15.-42. týdne těhotenství pomocí imunologického testu AmniSure s prahem detekce 5 ng/ml. Tento test má 100% specifitu a 99% senzitivitu [176]. Detekce PAMG-1 z cerviovaginálního sekretu dokáže předpovědět předčasný porod do 7 dnů u těhotenství se zvýšeným rizikem předčasného porodu [178].

Při tomto testu (Obrázek 6) se odebírá vzorek cervikovaginální tekutiny pomocí sterilního tampónu a eluuje se v lahvičce s rozpouštědlem po dobu 1 minuty. Poté se do lahvičky přidá testovací proužek se 2 zónami. První testovací zóna obsahuje protilátky anti-PAMG-1 a druhá anti-IgG protilátky (tzv. pozitivní kontrola). Je-li ve vzorku přítomen PAMG-1 glykoprotein, dojde k reakci s protilátkami proti PAMG, vytvoří se imunokomplex antigenu a protilátky, což se projeví viditelnou čárkou. V zóně pozitivní kontroly také dojde ke vzniku viditelné čárky. V tomto případě můžeme mluvit o tom, že u pacientky došlo k předčasnému prasknutí plodových membrán nebo i k předčasnému porodu. Není-li ve vzorku přítomen PAMG-1, nedojde k reakci s anti-PAMG-1, čárka se neobjeví, ale objeví se v zóně pozitivní kontroly [176].



Obrázek 6: AmniSure® ROM test pro prokázání přítomnosti PAMG-1, převzato z [176]

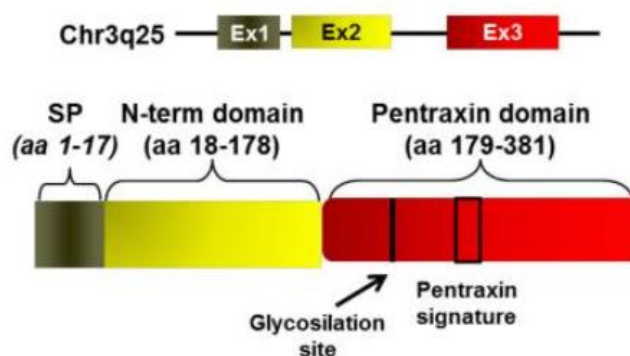
Pentraxin 3

Pentraxin 3 (PTX3) je dlouhý pentraxin s cyklickou pentamerní strukturou [179]. Dle primární struktury dělíme pentraxiny do dvou skupin – dlouhé a krátké. Oba druhy pentraxinů mají C-koncovou doménu, ale krátké pentraxiny se od dlouhých liší v tom, že N-terminální doména je navázána na C-koncovou doménu [180].

PTX3 je rozpustný protein, jenž hraje důležitou roli v regulaci přirozené rezistence vůči patologickým agens. Buňky přirozené imunity (makrofágy, monocyty) dokážou produkovat PTX3 v reakci na zánětlivé signály a aktivují TLR. Tím pádem PTX3 má hlavní funkci jako protein akutní fáze [181].

V 90. letech minulého století byl PTX3 objeven v endoteliálních buňkách a fibroblastech u lidí jako časný indukovaný gen. Navzdory zjevným podobnostem účinku se PTX3 liší od krátkých pentraxinů v mnoha základních aspektech, jako je organizace genů, chromozomální lokalizace, buněčné zdroje, indukující stimuly a rozpoznávané ligandy [182]. Molekulová hmotnost PTX3 je 42 kDa [183].

Primární sekvence proteinu PTX3 se skládá z 381 AMK, základní peptid tvoří 17 AMK (Obrázek 7) [184]. Lidský gen pro PTX3 se nachází na chromozomu 3q25. PTX3 kóduje gen, který se skládá ze tří exonů, z nichž první dva exony kódují vedoucí peptid proteinu a dlouhou N-terminální doménu (AMK 18-178) [185]. Třetí exon kóduje C-terminální doménu (AMK 179-381).



Obrázek 7: *Struktura pentraxinu 3, převzato a upraveno z [185]*

PTX3 je produkován monocyty a makrofágy, ale byl objeven i v nezralých dendritických buňkách, buňkách hladkého svalstva, synoviálních buňkách, chondrocytech, adipocytech nebo v ledvinových epitelálních buňkách [186]. V těchto buňkách je koncentrace PTX3 velmi nízká (méně než 2 ng/ml), ale v případě,

že se u pacienta objeví zánětlivá odpověď, infekce, endotoxický šok, sepse nebo septický šok, se koncentrace PTX3 proteinu ve vaskulárních buňkách a buňkách přirozené imunity mnohonásobně (200 až 800 ng/ml) a rychle zvýší (6 až 8 hodin) [181,182].

PTX3 funguje jako zánětlivý biomarker, využívající se i jako diagnostický biomarker u kardiovaskulárních onemocnění [187]. Během těhotenství byly v krvi matek objeveny zvýšené koncentrace PTX3 oproti netěhotným. Je to způsobeno tím, že těhotenství vyvolává v těle matky prozánětlivý stav, který je charakterizován fyziologickou aktivací vrozené imunity [188]. Koncentrace PTX3 se za fyziologických podmínek během gravidity nemění. Zvýšené hladiny PTX3 tak mohou hrát významnou roli i u předčasného porodu nebo preeklampsie. V roce 2012 Cozzi a spol. [189] objevili, že u žen s diagnostikovanou PE byla naměřena vyšší koncentrace PTX3 v krvi než u žen s bez PE. Zvýšená koncentrace PTX3 může vést ke zvýšenému riziku předčasného porodu nebo potratu [190]. U pacientek s diagnostikovaným předčasným porodem se objevily výrazně vyšší koncentrace PTX3 než u pacientek s fyziologickým těhotenstvím bez ohledu na to, jestli měly nebo neměly přítomnou intraamniální infekci [189].

Zvýšená hladina PTX3 v plazmě matky nemá souvislost s intraamniální infekcí, ale souvisí s předčasným porodem, PE a je důsledkem fyziologické i patologické aktivace zánětlivé odpovědi IS na porod. Proto díky včasnému objevení PTX3 v krvi matky lze snížit riziko zánětu v těle matky nebo předčasného porodu [191].

1.4 Kalretikulin

V roce 1974 byl poprvé identifikován kalretikulin (CALR) jako Ca^{2+} vazebný protein v sarkoplazmatickém retikulu kosterního svalstva, izolovali ho Ostwald a MacLennan [192]. CALR váže Ca^{2+} ionty s vysokou afinitou a následně byl pojmenován jako vysokoafinitní Ca^{2+} vazebný protein. O pár let později byl CALR objeven i v endoplazmatickém retikulu, jeho geny byly i u vyšších rostlin, savců, ale i dalších zvířat. V roce 1989 došlo poprvé k molekulárnímu klonování tohoto glykoproteinu Smitchem, Kochem a Fliegelem a jeho kolektivem [193]. Klonování v kombinaci s analýzou N-koncové aminokyselinové sekvence ukázalo, že CALR byl už několikrát „znovuobjeven“ a popsán jinými názvy, např. kalregulin, CRP 55,

protein podobný kalsekvestrinu nebo vysokoafinitní Ca^{2+} vazebný protein [192,194]. V roce 1985 Waismanův tým ze zmrazených jater identifikoval a izoloval protein, který váže Ca^{2+} s molekulovou hmotností 63 kDa a nazval ho kalregulin [194]. Koch a Macer v roce 1988 [195] studovali Ca^{2+} vazebné proteiny, které byly spojeny s membránami endoplazmatického retikula, a identifikovali sadu proteinů jako retikuloplazminy. Jeden z těchto proteinů měl molekulovou hmotnost 55 kDa a byl pojmenován jako CRP55 (retikuloplazmin vázající Ca^{2+} ionty). Koncem 80. let minulého století Van izoloval z membrány endoplazmatického retikula krysích jater čtyři Ca^{2+} vazebné proteiny [196]. Při studiu struktury rezidentních proteinů membrán endoplazmatického retikula Lewisův tým identifikoval, izoloval a popisoval různé proteiny, včetně proteinu ERp60 [197]. Sám Lewis dokázal, že aminokyselinová sekvence ERp60 odvozená z jeho cDNA (komplementární DNA) byla identická s CALR, proto se muselo jednat o jeden a týž protein [197]. Později se ukázalo, že kalregulin, CRP55 a ERp60 jsou ve skutečnosti kalretikulin.

Opas a jeho kolektiv navrhli, aby se tento protein nazýval retikulin. Název byl odvozen od lokalizace kalretikulinu v membránách sarkoplazmatického retikula [198]. Avšak po konzultaci s laboratořemi studující tento protein byl protein nazván jako CALR neboli protein vázající Ca^{2+} ionty lokalizovaný v membránách sarkoplazmatického retikula [193].

1.4.1 Výskyt kalretikulinu

Kalretikulin byl původně objeven v sarkoplazmatickém retikulu kosterního svalstva [193]. Později byl nalezen i v izolovaných buňkách endoplazmatickém retikula (ER) všech buněk s výjimkou prokaryotických buněk a kvasinek [198]. Také může být v cytoplazmatických granulích cytotoxických T-lymfocytů nebo v jádrech nádorových buněk dlaždicového tvaru [199].

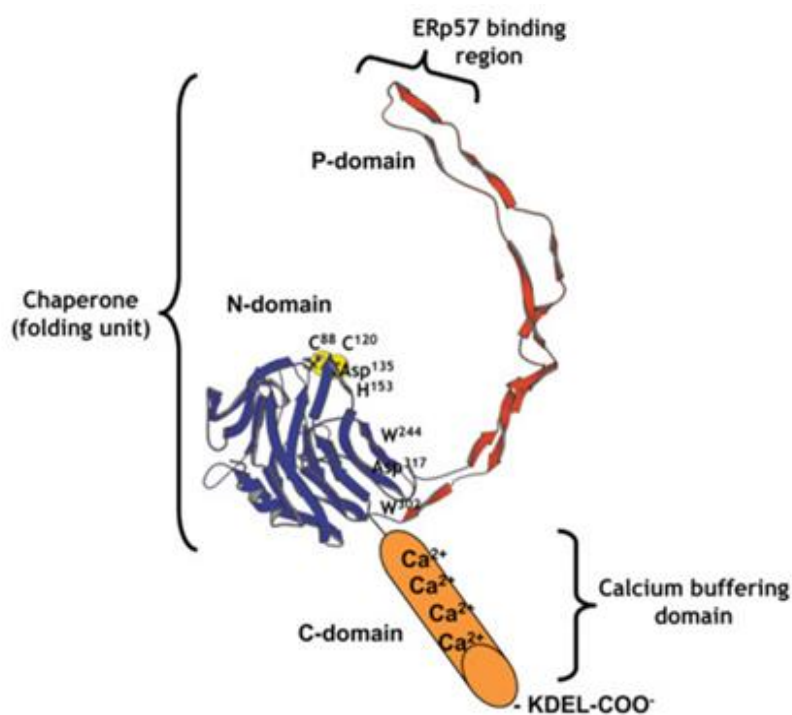
Kalretikulin se objevuje i na povrchu buněk ve velmi nízkých koncentracích a může být vylučován do krevního řečiště. Za fyziologických podmínek CALR asociuje s $\alpha_6\beta_1$ integriny a s α řetězcem hlavního histokompatibilního komplexu I (MHC I) bez β_2 mikroglobulinu [200]. Při patologických stavech se objevuje v moči, v krvi nebo v plodové vodě, tzv. extracelulárně nebo v apoptických tělískách [201]. K uvolnění CALR do extracelulárního prostoru dochází při nekróze či apoptóze nebo

při přítomnosti virů v těle. Důležitou roli při uvolnění CALR z intracelulárního prostředí hraje i porušení normální funkce endoplazmatického retikula, UV záření, stres, jenž je způsoben tepelným šokem nebo přítomnost těžkých kovů v těle [202].

Myší a lidský gen pro kalretikulin mají 70% homologii v nukleotidových sekvencích. Myší gen pro CALR se nachází na osmém chromozomu a lidský gen pro CALR je umístěný na lokusu p13.3-p13.2 devatenáctého chromozomu [203]. Jeho přítomnost byla prokázána pomocí imunologických a biochemických testů [197].

1.4.2 Struktura kalretikulinu

Kalretikulin je složen ze 400 aminokyselin a má 3 funkčně a strukturně rozdílné domény (N, P, C), které jsou členěny arbitrárně (Obrázek 8) [204]. Na Obrázku 8 je znázorněna globulární N-doména modře a centrální P-doména bohatá na prolin červeně. Koncová C-doména je vyobrazena žlutě. Žlutě zbarvené kuličky představují cysteinové zbytky (Cys88 a Cys120), které tvoří thiolový můstek v CALR. Také je vyznačen esenciální His153 a domnělá místa pro navázání sacharidu. Je popsán i vazebné místo ERp57 [204].



Obrázek 8: 3D model N- a P- domény kalretikulinu, převzato a upraveno z [204]

V roce 1994 Matsuoka [205] objevil, že N-terminální doména CALR se nachází mezi 1 a 180 aminokyselinou a má globulární strukturu. N-terminální doména je složena ze 2 krátkých α -helixů a z 8 antiparalelních β -řetězců s jedním disulfidickým můstkem. Hlavní význam má disulfidický můstek při správném skládání N-terminální domény. Kromě vazby zinečnatých iontů, N-terminální doména *in vitro* interaguje s některými chaperony endoplazmatického retikulu [204]. N-doména CALR také navazuje vazbu s nukleovými kyselinami (RNA virus zarděnek) a s DNA vazebnou doménou jadrových receptorů [204].

P-doména CALR, která se nachází mezi 181 až 290 AMK, je složena ze 3 antiparalelních β -řetězců, ze 3 krátkých α -helixů a ze 2 skupin aminokyselinových repetitiv [204]. Tato doména je sekvenčně podobná některým chaperonům, které vážou Ca^{2+} ionty (kalmegin a kalnexin) [206], také obsahuje velké množství prolinu. Nachází se zde nízkokapacitní, ale vysokoafinitní vazebná místa pro Ca^{2+} ionty. P-doména naváže 1 mol Ca^{2+} iontu na 1 mol kalretikulinu [204].

Poslední C-doména kalretikulinu je mezi 291 až 400 AMK a je zde vysokokapacitní místo pro Ca^{2+} ionty s nízkou afinitou. C-doména má vazebnou kapacitu na 20 až 30 mol Ca^{2+} iontů na 1 mol CALR [192] a je tvořena α -helixem. C-doména je zakončena karboxylovým koncem a je bohatá na kyselé AMK, také obsahuje retenční signál pro endoplazmatické retikulum (KDEL). KDEL pomáhá CALR k umístění do lumen endoplazmatického retikula a je složen ze 4 aminokyselin (lysin, aspartát, glutamát a leucin) [207]. Hlavní funkcí C-domény je regulace interakcí CALR s ostatními proteiny (ERp57, protein disulfid izomeráza). N-doména a P-doména jsou zodpovědné za to, že se kalretikulin chová jako chaperon, a obsahují nejkonzervovanější aminokyselinovou sekvenci [208].

1.4.3 Význam a funkce kalretikulinu

Kalretikulin je unikátní, rozpustný, rezidentní glykoprotein nacházející se v lumen ER. Jedná se o pleotropní molekulu, jež má funkce v lumen ER (intracelulární) i mimo něj (extracelulární). Molekulová hmotnost CALR je 46 kDa [193], avšak SDS-PAGE analýza (dle Laemmli) ukázala, že se molekulová hmotnost CALR pohybuje v rozmezí od 60 do 63 kDa, což je způsobeno díky velkému

množství C-terminální domény [195]. V roce 1974 Ostwald a MacLennan [192] odhalili, že v neutrálním pH je molekulová hmotnost CALR 55 kDa.

Kalretikulin má stejně jako kalsekvestrin vysoce nabitou C-terminální oblast. CALR má vypočítaný izoelektrický bod 4,14 [193] avšak pro nativní protein se hodnota izoelektrického bodu pohybuje od 4,65 do 4,67 [194]. Vědci se domnívají, že tento rozdíl je pravděpodobně zodpovědný za aberantní pohyb CALR v polyakrylamidových gelech.

V roce 1991 Baksh a Michalak [209] zjistili, že CALR má 2 různá vazebná místa pro Ca^{2+} ionty. Jedno vazebné místo je s vysokou kapacitou, ale nízkou afinitou, a druhé místo je s nízkou afinitou, ale s vysokou kapacitou. K tomuto pokusu použili rekombinantní i nativní kalretikulin. Určili, že tyto různé typy vazebných míst se nacházejí na rozdílných oblastech proteinu.

Kalretikulin je vysoce konzervovaný a všudypřítomný protein a účastní se mnoha funkcí v buňkách. Jakékoliv změny v expresi a funkci CALR se projeví i na různých buněčných funkcích. V lumen ER má CALR dvě hlavní funkce – regulaci Ca^{2+} homeostázy a chaperoning [204].

CALR se chová jako hlavní Ca^{2+} vazebný protein hrající významnou roli v buňce, protože ukládání Ca^{2+} iontů v lumen sarkoplazmatického nebo ER má centrální význam pro regulaci koncentrací volných Ca^{2+} iontů v cytoplazmě [210]. Dále mají vápenaté ionty význam v mnoha buněčných funkcích, včetně chaperoningu podobného lektinu, ukládání a signalizace Ca^{2+} , regulace buněčné adheze, genové exprese a autoimunity [211]. Ca^{2+} ionty jsou z cytosolu vycytávány pomocí vápenaté ATPázy, ukládány v membránách a uvolňovány pro další vhodné stimuly, a to pomocí speciálních kanálů. Při uvolnění Ca^{2+} iontů v membránách se rozdělí do výše zmíněných vazebných míst. Toto rozdělení hraje významnou roli, protože díky němu dochází ke snížení koncentrace volných Ca^{2+} iontů, proti kterému musí působit Ca^{2+} ATPáza [198].

S relativně nízkou afinitou dokáže CALR, kromě vápenatých iontů, navázat také 14 molů zinečnatého iontu (Zn^{2+}) na 1 mol proteinu [212]. Vazba Zn^{2+} na CALR vyvolává závažné konformační změny (na rozdíl od vazby Ca^{2+} iontů) v proteinu, jež se dají prokázat změnou ve vnitřní fluorescenci proteinu. Tyto konformační změny závislé na Zn^{2+} zahrnují i zvýšenou hydrofobicitu proteinu [213]. Bohužel zatím není

známo, kde v proteinu se tato vazba nachází a není znám funkční význam tohoto druhu vazby na CALR. Je pravděpodobné, že Zn^{2+} ionty uvolněné z vazby na CALR mají určité neuromodulační účinky v synaptických vezikulách v nervových zakončení [214]. Tyto synaptické vezikuly mohou obsahovat velké množství volného CALR, proto můžeme říct, že CALR má významnou roli v regulaci hladin zinečnatých iontů v synaptických vezikulách [214].

Kalretikulin plní také roli chaperonu podobnému lektinu a má vysoký stupeň homologie s kalnexinem [204,215]. Je vysoce univerzální, protože se zapojuje do procesu tzv. kontroly kvality během syntézy různých molekul, včetně iontových kanálů, povrchových receptorů, transportérů a integrinů [215]. Zatím ale není přesně rozpoznáno, jak CALR pomáhá při skládání proteinů, jak působí společně s jinými chaperony ER a jakou roli v těchto procesech hrají vápenaté ionty [204].

Kalretikulin má v buňce i jiné významné funkce a vlastnosti, např. jeho lokalizace v jaderném obalu a jádře, stejně tak jako v ER [198], nebo výrazná doménová struktura proteinu. Další zajímavostí je, že má sekvenční podobnost s jinými, zcela odlišnými, buněčnými proteiny a přímo s nimi asociuje. V rozpustné formě a ve spojení s homologním membránově vázaným proteinem kalnexinem se CALR váže na glykoproteiny [216]. Dále byla popsána změna exprese ve vztahu k buněčné proliferaci a syntéze některých proteinů a také byla objevena určitá souvislost s autoimunitními chorobami, účastní se embryogeneze, fagocytózy buněk a potenciálně může indukovat imunitu proti nádorům [204].

Mimo ER CALR moduluje buněčnou adhezi, expresi genu citlivého na steroidy *in vivo* a *in vitro*, signalizaci Ca^{2+} iontů závislou na integrinu [217]. První experiment *in vitro* poukázal na to, že CALR se může podílet na funkci integrinu a buněčné adhezi tím, že se naváže na afinitní kolonu se syntetickým peptidem, způsobem závislým na Ca^{2+} iontech. Vědci proto navrhli, aby se CALR vázal přes C-terminální konec α -integrinu a moduloval jeho funkci [217]. K regulaci aktivity integrinu *in vivo* přímou vazbou ale musí existovat CALR, jenž je spojený s cytoplazmatickým kontaktem. Doposud však nebyl CALR detekován v cytosolu ani spojen s cytoplazmatickými kontakty [218].

1.4.4 Kalretikulin a jeho význam v autoimunitě

Kalretikulin dokáže regulovat intracelulární homeostázu vápníku, respektive Ca^{2+} iontů, a přes MHC I reguluje vystavení antigenních peptidů na buněčné membráně a zajišťuje správné ukládání proteinů [219]. Větší zájem vědců je zapříčiněn díky nově odhaleným imunomodulačním účinkům v extracelulárním prostoru. CALR funguje jako molekula molekulového vzoru, která je spojena s nebezpečím, jakmile se nachází mimo buňku [220]. Pokuse CALR nachází na dendritických buňkách, má funkci jako receptor pro autokrinně produkováný komplementový faktor 1q (C1q). C1q je upregulován během signalizace CD40L/CD40, což je klíčový signál pro Th-lymfocyty pomáhající k efektivnímu zrání dendritických buněk [221]. Rozpustný CALR dokáže podpořit diferenciaci CD1dhi CD5+ B-lymfocytů na buňky, produkující protilátky. Další funkcí rozpustného CALR je uvolňování $\text{TNF}\alpha$ a IL-6 z makrofágů, které bylo dříve indukováno scavengerovým receptorem A [222].

1.4.5 Význam kalretikulinu u předčasného odtoku plodové vody

Kalretikulin byl objeven v plodové vodě jako jeden ze specifických proteinů PPRM. V roce 2012 Tambor a kol. [223] objevili vyšší koncentrace CALR v plodové vodě u pacientek s PPRM, která byla komplikovaná infekční histologickou chorioamnionitidou.

Profesor Kacerovský [224] se svým kol. rozhodl udělat studii na stanovení koncentrace CALR v plodové vodě pro včasné rozpoznání intrauterinního zánětu u těhotných žen s PPRM. Celé studie se zúčastnilo 168 žen, u 20 % z nich byl potvrzen intrauterinní zánět. Do studie byly vybrány ženy s gestačním věkem od 24. + 0. až do 36. + 6. týdne. PPRM byl diagnostikován pomocí sterilního vaginálního zrcadla k ověření odtoku plodové vody do pochvy.

Ženy s PPRM do 34. týdne gestace byly po dobu 48 hodin léčeny antibiotiky, tokolytiky a kortikosteroidy. Po 34. týdnu těhotenství byla podávána pouze antibiotika. Ženy s prokázanou intrauterinní infekcí po 28. týdnu gestace byly léčeny aktivním způsobem, nedostávaly tokolytika, ale pouze antibiotika a kortikosteroidy. Všem pacientkám byla odebrána plodová voda pro stanovení IL-6, ze stejného vzorku bylo provedeno mikrobiologické vyšetření (PCR test k detekci DNA mikroorganismů)

druhu *Mycoplasma hominis*, *Chlamysia trachomatis* a *Ureaplasma sp.* Vzorek plodové vody byl ještě zpracován pro stanovení 16s RNA a část plodové vody byla centrifugována (15 minut/2000 g) a supernatant byl zamražen při -70 °C pro imunologické vyšetření [224].

Koncentrace CALR v plodové vodě byly stanovovány ELISA metodou. Použita byla souprava ELISA pro CALR a mez detekce byla 0,264 ng/l. Vzorky plodové vody byly zředěny 1:2 a hodnoty absorbance byly měřeny při 450 nm [224].

Studie neodhalila přesnou roli CALR v patofyziologii PPROM ani to, jak se CALR do plodové vody dostává. Vědci se domnívají, že CALR se dostane do plodové vody z povrchu neutrofilů, protože při patologických stavech se zvyšují koncentrace CALR v tělních tekutinách. Zvýšené koncentrace často bývají spjaty s přítomností nebo difúzí infiltrací neutrofilů [225]. Možným zdrojem CALR v plodové vodě může být také difúze infiltrace placenty nebo fetálních membrán buňkami neutrofilů.

Profesor Kacerovský odhalil [124], že koncentrace CALR v plodové vodě u žen s intrauterinním zánětem byla vyšší než u žen s nesterilním intrauterinním zánětem. Dále zjistil, že ženy s mikrobiální invazí do amniální dutiny (MIAC) mají vyšší koncentrace CALR v plodové vodě než ženy bez MIAC. Může to být způsobeno tím, že přítomné bakterie v plodové vodě vyvolávající zánět zvyšují koncentraci CALR v plodové vodě [124,224]. Dále objevil, že pacientky s nesterilním intrauterinním zánětem mají vyšší hladiny CALR než pacientky se sterilním zánětem, pacientky bez MIAC a intrauterinního zánětu a pacientky s mikrobiální kolonizací, což může být spojeno se zvyšující se koncentrací CALR při patologických stavech [225].

Koncentrace CALR v plodové vodě pozitivně koreluje s přítomností *Ureaplasma sp.* Toto zjištění může být dáno tím, že intenzita intrauterinní zánětlivé odpovědi na druh *Ureaplasma sp.* je závislá na dávce [124,224]. Koncentrace CALR také pozitivně koreluje s koncentrací IL-6 v plodové vodě, indukuje produkci IL-6 a TNF α z makrofágů. Indukce probíhá v důsledku aktivní transkripce mRNA prostřednictvím mitogen aktivovaných proteináz a nukleárního faktoru kappa zesilovače lehkého řetězce aktivovaných B-lymfocytů [222].

Byla stanovena tzv. optimální cut-off hodnotu pro CALR, a to 81,4 ng/ml a může být použita pro průkaz počáteční fáze intrauterinního zánětu u žen s PPROM.

1.4.6 Kalretikulín a jeho význam v preeklampsii

Extracelulární i intracelulární CALR ovlivňuje mnoho buněčných funkcí, včetně adheze, migrace a proliferace. Zejména jeho účinky na vaskulární endoteliální buňky mohou být relevantní pro normální těhotenství a PE [218]. O tom, jakou má CALR roli v těhotenství a v jeho komplikacích se stále ví málo, ale práce Pata a jeho kolegů z roku 2006 prokázala, že peptid nadměrně exprimovaný při PE (neurokinin-B) indukuje expresi CALR.

Gu se svým kolektivem [226] v roce 2008 provedli studii, ze které vyplývá, že za určitých podmínek se CALR uvolňuje z buňky do periferního krevního řečiště. Tímto stavem může být i těhotenství, protože v periferní krvi těhotných žen byly nalezeny vysoké koncentrace CALR. Podle této studie se CALR zvyšuje na počátku těhotenství a jeho koncentrace zůstává zvýšená po celou dobu gravidity [226].

Zatím není znám mechanismus, kterým se CALR uvolňuje z buněk do extracelulárního prostoru. Bylo navrženo několik teorií vysvětlujících překonávání retenční vlastnosti CALR a jak se dostává na povrch [227]. Jedna z teorií tvrdí, že CALR může být exprimován v různých izoformách neobsahujících KDEL. Receptor pro KDEL může být transportován na povrch v komplexu s CALR nebo proteázami ER, jež mohou zkrátit molekulu, tak že sekvence KDEL není přítomna. Kromě toho může mechanismus retence ER a také glykosylace CALR hrát roli v jeho pohybu mimo ER [227]. Studie z roku 2001 neprokázala glykosylaci lidského placentárního CALR nenašla, ale našla důkaz o přítomnosti C-terminálního hexapeptidového zkrácení, které zkrátilo signál KDEL. Vysvětlením je štěpení neznámou proteázou s vysokou specifitou. V případě, že by k tomuto štěpení došlo v ER, usnadnila by se tím translokace placentárního kalretikulínu do jiných buněčných částí [227].

Další teorie říká, že je CALR uvolňován buněčnou lýzou a buněčnou smrtí. Vilózní trofoblastové buňky nepřetržitě procházejí procesem diferenciací a fúzí s překrývajícím se syncytiotrofoblastem během těhotenství. Obnova této vnější epiteliální vrstvy zahrnuje apopticky zprostředkovanou buněčnou fragmentaci a deportaci jak buněčného, tak subcelulárního odpadu do oběhu matky [228]. CALR přítomný v syncytiotrofoblastu může být tímto procesem uvolněn do krve matky z placenty nezávisle na procesech fragmentace a deportace buněk [226].

Gu [385] ve své studii prokázal vyšší koncentrace CALR v plodové vodě u žen s PE. Jelikož se CALR nachází všude, jakýkoliv z orgánů, který je narušen PE, může indukovat další uvolnění CALR do oběhu matky [226]. I neutrofily mohou být zdrojem CALR, protože při PE se aktivují a jejich aktivace způsobuje další uvolňování CALR.

Gu a kol. [226] přišli na to, že účinek CALR na vaskulární endoteliální buňky se liší podle konkrétního vaskulárního řetězce a dosažení lokální koncentrace. Vazba CALR na jiné krevní proteiny může ovlivnit jeho aktivitu. Cirkulující CALR může usnadnit snížení systémové vaskulární rezistence matky, která doprovází časné těhotenství, prostřednictvím zvýšené endoteliální produkce oxidu dusného. Vzhledem k tomu, že změny funkce endoteliálních buněk jsou charakteristické pro PE, může další zvýšená koncentrace CALR přispět ke směsi antiangiogenních faktorů, které jsou za tyto změny zodpovědné [226].

Zvýšená buněčná exprese CALR zvyšuje kapacitu ukládání vápníku v ER [204]. Nejsou známky toho, že by změny v extracelulární expresi CALR ovlivňovaly homeostázu vápníku, ale plazmatická koncentrace vápníku je u žen s PE snížena ve srovnání s fyziologickými graviditami [229]. Proto je suplementace vápníku v těhotenství důležitá, jelikož snižuje vážnost preeklampsie. Zvýšené koncentrace CALR v mateřské krvi mohou tedy přispívat k narušené vápníkové homeostáze, která je pozorovaná u preeklampsie [230].

1.5 Imunomagnetická separace

Imunomagnetická separace (IMS) je nově vznikající technologie, jejíž využití v biologických vědách bylo až do 70. let minulého století značně omezeno. Dnes se řadí mezi rutinní metody, jelikož se využívají pro separaci buněk, proteinů (peptidů) nebo nukleových kyselin z biologických suspenzí [231]. Metoda je vhodná i pro velké proteinové komplexy, které zůstávají aktivní, ale v kolonové chromatografii se rozpadají [232].

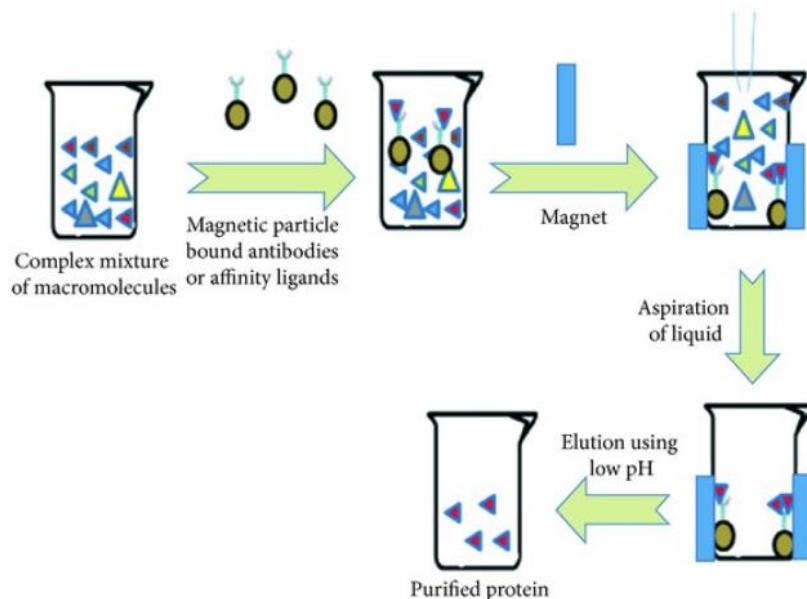
IMS je šetrná a nedestruktivní metoda, při které se cílové složky zachycené na magnetických materiálech snadno a selektivně izolují ze vzorku [233]. IMS je schopna usnadnit a urychlit separační a purifikační postupy a lze ji efektivně kombinovat s jinými metodami [234].

1.5.1 Princip imunomagnetické separace

IMS se řadí mezi imunoafinitní chromatografii (IAC), která propojuje kapalinovou chromatografii se specificky vázanou protilátkou a antigenem [235]. IAC používá stacionární fázi, která se skládá z protilátky nebo reagentie s protilátkou, kdežto IMS má protilátky proti antigenům navázané na povrchu magnetických částic. Tyto magnetické materiály jsou třeba sférické kuličky s nepravidelným tvarem, který zvětšuje aktivní plochu vazby a lepší vazbu ligandu [236]. Jako magnetické materiály se využívají superparamagnetické částice s vylepšenými vlastnostmi [237].

Superparamagnetické částice jsou připravovány ze syntetických polymerů, biopolymerů nebo porézního nebo anorganického skla. Tyto částice se chovají jako superparamagnetické a reagují na vnější magnetické pole. V přítomnosti magnetického pole se částice stávají magnetickými, ale mimo něj už ne. V případě, že by částice zůstávaly zmagnetizované, docházelo by ke shlukování i k omezení vazebné kapacity částic [238].

Imunomagnetická separace je založena na funkcionalizaci magnetických materiálů [239]. Tyto materiály jsou adsorbenty vhodné pro biologické makromolekuly díky jejich velkému povrchu, snadné funkcionalizaci, pohodlné manipulaci a dobré biokompatibilitě. V praxi to znamená, že magnetické materiály, které vykazují určitou afinitu k izolované struktuře, jsou smíchány s testovaným vzorkem, který obsahuje námi separované látky. IMS využívá k separaci afinitní ligandy spojené s magnetickými částicemi (Obrázek 9) [240]. Během inkubace dochází k vazbě cílové látky na magnetické částice. Celý magnetický komplex je poté oddělen od vzorku pomocí magnetického pole. Nenavázané složky nebo složky se slabou vazbou se odstraní od imobilizovaného ligandu vhodným promývacím pufrem. Po vymytí těchto složek může být izolovaná cílová sloučenina eluována vhodným elučním činidlem a použita pro další kroky. Tyto cílové sloučeniny jsou eluovány v relativně čisté formě buď pomocí denaturačních činidel, změnou faktorů (pH, polarita, iontová síla), nebo pomocí kompetitivních analogů [241,242].



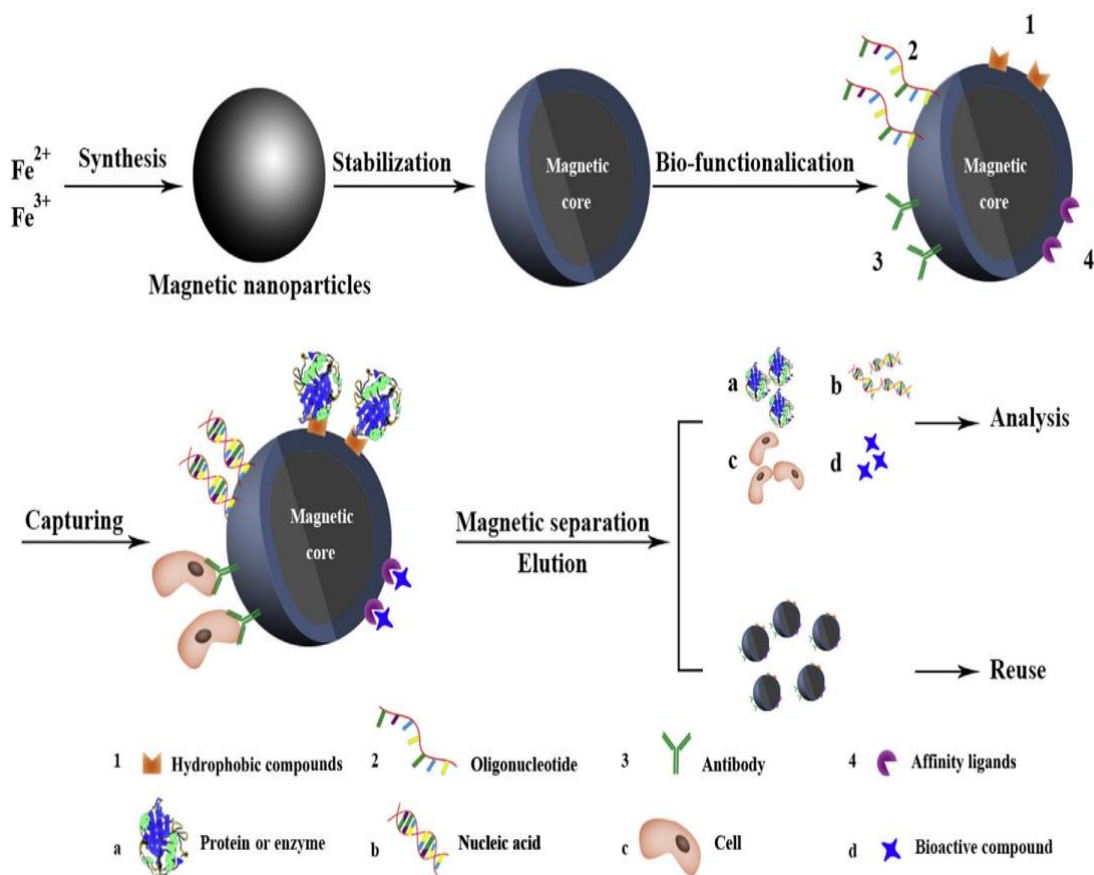
Obrázek 9: Imunomagnetická separace látek, převzato z [240]

1.5.2 Biofunkcionalizace povrchu magnetických částic

Přestože došlo k mnoha významným pokrokům v syntéze magnetických částic, udržení jejich stability po dlouho dobu bez aglomerace a srážení je stále problematické. Stabilita magnetických částic je zásadním požadavkem pro všechny magnetické částice, proto bylo nutné vyvinout dobrou strategii, která by vylepšila jejich chemickou stabilitu a ochranu [243]. Nejlepší strategií je modifikace povrchu magnetických částic [244]. Modifikace se provádějí za účelem připevnění magnetických značek k terčům nebo imobilizace terčů na magnetické nosiče či adsorbenty. Vazba magnetických značek na cíle je zprostředkována afinitními ligandy (protilátky proti povrchovým epitopům) nebo jiným typem interakcí [241].

Jedním typem modifikace je biofunkcionalizace (Obrázek 10), která se provádí u magnetických částic mající afinitní nebo hydrofobní skupiny nebo na částicích s protilátkami na svém povrchu. Biofunkcionalizace se dělá pro potlačení interakcí mezi částicemi nebo pro jednoduchou adsorpci. Takto modifikované magnetické částice lze použít pro DNA hybridizaci, nebo enzymatická stanovení či pro separaci proteinů [245]. Modifikované magnetické částice (MNP) s protilátkami lze používat i k izolaci buněk exprimujících antigen prostřednictvím speciálních magnetických

reakcí. MNP s vhodnými oligonukleotidy se používají pro separaci a purifikaci nukleových kyselin pomocí specifického párování bází [246].



Obrázek 10: Obecný postup magnetické separace při přípravě vzorku pro biologickou analýzu, převzato z [245]

Pro biofunkcionalizaci se používají syntetické a přírodní polymery nebo anorganické materiály. Mezi tyto polymery patří polyethylenglykol a polyvinylalkohol. Ani jeden z nich není toxický, je neimunogenní a biokompatibilní [247]. Povrch magnetických částic lze modifikovat i biopolymery, příkladem může být chitosan, který má výborné biologicko-fyzikálně-chemické vlastnosti. Díky přítomnosti $-NH_2$ a $-OH$ funkčních skupin lze MNP použít pro imobilizaci biomolekul [248].

Povrch magnetických částic lze modifikovat silanizací za pomoci některých silanizačních činidel, např. glycidyloxypropyltriethoxysilan, 3-aminopropyl(triethoxysilan). Silanizace se provádí u magnetických částic, jež jsou

zbaveny organických látek. Při silanizaci je vnášena např. $-NH_2$ skupina, která se váže s proteiny nebo enzymy. Proteiny mohou vázat nebo adsorbovat na hydrofobní povrchy, již se tvoří prostřednictvím polymerního povlaku [249]. Jako stabilizátory povrchu magnetických částic se používají alkansulfonáty nebo kyselina citrónová [244]. Další možností modifikace magnetických částic je použití dextransu, k jeho aktivaci slouží jodistan sodný a dochází k tvorbě polyaldehydů dextransu, které dokážou reagovat s $-NH_2$ skupinou proteinu [244].

Biofunkcionalizované magnetické částice jsou slibné pro aplikaci v katalýze, biologickém značení nebo bioseparaci [243]. Magnetická částice, která prošla biofunkcionalizací musí ale splňovat některé specifické podmínky, mezi které patří potlačení mezičásticové interakce, biokompatibilita a chemická modifikace nezbytná pro imobilizaci biomolekul [244].

1.5.3 Možnosti imobilizace ligandů

K imobilizaci ligandů se často využívají funkční skupiny nacházející se na povrchu magnetických částic ($-COOH$, $-OH$, $-NH_2$), v některých případech mohou být magnetické částice už v aktivované formě (např. epoxyaktivované nebo tosylaktivované) [238].

Vysokomolekulární i nízkomolekulární biologicky aktivní látky lze modifikovat mnoha různými způsoby. Pro imobilizaci biologicky aktivních látek se používají fyzikální techniky, magnetolipozomy, nekovalentní nebo kovalentní vazby [244].

Fyzikální techniky imobilizace ligandů

Mezi fyzikální techniky imobilizace ligandů patří zabudování biologicky aktivních látek do magnetické gelové matrice nebo fyzikální sorpce [244]. První zmíněná technika zabudovává biologicky aktivní látky nebo celé buňky do magnetické gelové matrice. Tyto matrice jsou vytvořeny z proteinů (kolagen, vaječný bílek, želatina), ze syntetických polymerů (polyuretany, různé typy pryskyřice, polyakrylamid) a ze sacharidů (algináty, karagenany, agaróza, agar). Výhodou gelové matrice je zadržování vody, což je důležité pro uchování biologické aktivity imobilizovaných biomolekul. Hydratované a měkké gely dokážou ukotvit biologicky aktivní látky nebo buňky. Díky tomu, že je gelové prostředí podobné fyziologickému

prostředí, nedochází k narušení biologických funkcí ani k denaturaci biologicky aktivních látek nebo buněk. Nevýhodou techniky je postupné uvolňování imobilizované biomolekuly [244].

Pro reverzibilní imobilizaci proteinů na povrch magnetických částic lze využít fyzikální sorpci. Ač je tato metoda jedna z nejstarších, má jednoduchý a levný postup. Její nevýhodou je nízká stabilita a spolehlivost ve srovnání s kovalentní vazbou [244].

Využití magnetolipozomů k imobilizaci ligandů

Pro imobilizaci biologicko-aktivních látek lze využít i magnetolipozomy, které využívají pro imobilizaci enzymů, vázané na membrány. Mezi tyto enzymy se řadí cytochrom c oxidázy, u kterého se výrazně zvyšuje stabilita i aktivita po imobilizaci na magnetolipozomy ve srovnání s volným enzymem [244].

Nekovalentní vazba ligandů

Pro imobilizaci biologicko-aktivních látek se používá technika, jež je založena na využívání magnetických částic, které jsou imobilizovány Streptavidinem, avidinem nebo histidinem a vykazují vysokou afinitu k biotinu (vitamin H a B7). Streptavidin je protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*. Jedná se o tetramer vykazující nižší nescifické interakce a není glykosilovaný. Avidin je glykoprotein pochází k vaječného bílku a má 4 stejné podjednotky (homotetramer). Každá podjednotka obsahuje vazebné místo pro biotin s vysokou afinitou [244].

Nejprve dojde k biotinylnaci biologicky-aktivních látek, jež mají být imobilizovány. Při biotinylnaci dochází k vnesení biotinové skupiny na povrch biologicky-aktivních látek [244]. Následně jsou tyto látky vázány na magnetické částice s využitím interakce mezi Streptavidinem (avidinem, histidinem) a biotinem a vzniklý komplex odolává vyššímu pH, silným denaturačním činidlům a vysokým teplotám, navíc se jedná o velmi pevný komplex [250].

Možností imobilizace protilátek na povrchu magnetických částic nekovalentní vazbou je využití Proteinu A nebo G. Protein A je imobilizovaný a izoluje se z bakterie *Staphylococcus aureus*. Protein A interaguje s Fc oblastí IgG protilátky s vysokou specifitou a afinitou, zároveň nechává volné specifické místo pro antigen. Protein G

je také imobilizovaný a izoluje se z bakterie *Streptococcus sp.* Interaguje s Fab oblastí IgG protilátky, jeho afinita k IgG je větší než u proteinu A [238].

Kovalentní vazba ligandů

Žádoucí je vytvoření silné kovalentní vazby mezi povrchem MNP a molekulou proteinu [245]. Silné kovalentní vazby lze dosáhnout pomocí vazebné reakce mezi specifickou skupinou ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CONH}_2$) na povrchu MNP a funkční skupinou (histidin, tyrosin, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$) na biologicko-aktivní molekule za použití konjugačního činidla [244].

Je-li povrch magnetické částice modifikovaný $-\text{NH}_2$ skupinou, jako konjugační činidlo se používá glutaraldehyd, který je běžně dostupnou chemickou látkou rozpustnou ve vodě a dostatečně reaktivní a šetrnou k proteinům. Díky glutaraldehydu vznikají kovalentní vazby mezi magnetickou částicí a proteinem, dochází k zesílení biomolekuly a ke stabilizaci výsledné struktury [244].

V případě, že je povrch magnetické částice modifikovaný $-\text{COOH}$ skupinou, jako konjugační činidlo se použije karbodiimid umožňující reakci mezi $-\text{NH}_2$ skupinou imobilizované látky a $-\text{COOH}$ skupinou. Pro aktivaci karboxylových skupin se jako činidlo se nejčastěji používá hydrochlorid 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] karbodiimidu (EDAC), který je rozpustný ve vodě. Dále je možné použít N,N-dicyklohexylkarbodiimid (DCC). Pro kovalentní imobilizaci citlivějších proteinů se používá karbodiimid a sulfovaný N-hydroxysukcinimid (Sulfo-NHS) nebo N-hydroxysukcinimid (NHS). Výhodou využití karbodiimidu s Sulfo-NHS (NHS) je klidnější průběh celé reakce, vzniklý produkt je velmi stabilní a během reakce nedochází ke vzniku nežádoucích meziproductů [244].

Kovalentní vazby ligandů je nejčastěji využívaná technika pro imobilizaci, je finančně nejvýhodnější a stabilita magnetických částic je vysoká. současně nepotřebuje regeneraci magnetických částic. V případě, že chceme vázat protilátky na reaktivní skupiny aktivovaných magnetických částic, jedná se o nejrychlejší a nejlevnější metodu vazby protilátky k pevné (stacionární) fázi [244,251]. Tato technika má jednu nevýhodu a tou je různá orientace funkčních skupin protilátky, která může způsobit blokaci vazebného místa a následnou ztrátu aktivity protilátky [252].

1.5.4 Imunosorbenty

Při IMS se využívá stacionární fáze, jejíž efektivita je ovlivněna schopností vázat protilátky, nebo jakou má biologickou, chemickou či mechanickou odolnost. Stacionární fáze může být vyrobena ze syntetických polymerů (polyethersulfony nebo akrylamidy) nebo ze sacharidů (dextran, agaróza, celulóza) [253].

Imunosorbenty jsou magnetické částice s navázanými imobilizovanými monoklonálními protilátkami sloužící pro záchyt specifických antigenů [254]. Před použitím musíme imunosorbent aktivovat, poté se na imunosorbent nanese vzorek a naváže se cílová látka tak, že je složitá směs antigenů (proteinů) vedena skrz imunosorbent a imobilizovaná protilátka zachycuje antigen (protein). Všechny nežádoucí látky jsou vymyty a cílová struktura může být eluována [255].

Chceme-li cílovou látku eluovat, musíme nejprve narušit vazby, které vznikly v komplexu antigen-protilátka. Tyto vazby mezi protilátkou a antigenem jsou tvořeny nekovalentními vazbami (vodíkové můstky, van der Waalovy síly, hydrofobní interakce) a lze je narušit specifickou nebo nespecifickou elucí. Při eluci se používá vhodné eluční činidlo a mění se podmínky při separaci, tak aby bylo možné získat antigen (protein) [256].

U specifické eluce je cílová látka eluována z vazby na imobilizovanou protilátku (ligand) roztokem jiné látky mající afinitu k separované cílové látce nebo imobilizované protilátce (ligandu). O vazbu na separovanou látku s imobilizovanou protilátkou může soutěžit volný ligand, avšak musí být ve vyšší koncentraci. Jedná se o kompetitivní proces, který je velmi efektivní a specifický, avšak i drahý, protože volný ligand je drahý a vzácný. Proto se o tohoto typu eluce ustupuje zejména v běžném laboratorním provozu [257].

U nespecifické eluce se vazba mezi cílovou látkou a imunosorbentem naruší pomocí pufrů s deformujícím účinkem. Tyto pufrы mění strukturu imobilizovaného ligandu nebo separované látky, dojde k narušení vazebných center, která už nejsou komplementární, a komplex antigen-protilátka se rozpadne. Mezi pufrы s denaturačním účinkem se řadí chaotropní činidla (draselné a sodné thiokyanáty, guanin, urea), která naruší rovnováhu mezi hydrofobní a hydrofilní složkami [256]. Narušit vazbu mezi cílovou látkou a imunosorbentem lze i pomocí změny pH prostředí nebo odstranění iontů, jež jsou důležité pro biologickou aktivitu. Většinou se ke změně

pH používají kyselá činidla (pH 1–3), protože alkalická činidla mohou způsobit denaturaci proteinů [257]. I organická rozpouštědla mohou narušit vazbu, avšak např. metanol má denaturační účinky na protilátky, takže tento způsob eluce není moc vhodný [253].

IMS na těchto imunosorbentech může probíhat opakovaně, avšak u určitých druhů protilátek se s častějším opakováním může snížit účinnost separace. Do doby, než je imunosorbent znovu použit, je uskladněn v lednici při 4 °C v PBS pufru pH 7,4 s přídatkem 0,02% azidu sodného. Před každou další analýzou musí být regenerován [255]. Funkčnost imunosorbentu je závislá na stacionární fázi (nosiči), na kterém je imobilizovaná protilátka. Účinné imunosorbenty by měly mít fyzikální, chemickou i mechanickou stabilitu, dobré vlastnosti toku, přijatelný pokles tlaku a minimální nespecifickou vazbu [258].

1.5.5 Způsoby provedení imunomagnetické separace

Jsou dva hlavní způsoby, kterými lze provést IMS biologických látek. Při prvním způsobu není potřeba, aby byl vzorek nějak speciálně upraven. Upravuje se v případě, že má dostatečné vnitřní magnetické momenty, které mají paramagnetické nebo seromagnetické molekuly, jako je ferritin, deoxygenované erythrocyty nebo hemoglobin [259]. Druhý způsob provedení je složitější, protože je potřeba provést magnetické modifikace, kdy je nemagnetická složka buňky označena magnetickou částicí. Magnetické modifikace se provádějí u diamagnetických molekul se supramolekulárními strukturami [241].

IMS je možné provádět v nepřímém nebo přímém režimu. V nepřímém režimu se k roztoku nebo suspenzi přidají volné afinitní ligandy (vhodné protilátky), aby bylo možné provést interakci s cílovými sloučeninami. Po vymytí přebytečného nenavázaného afinitního ligandu z roztoku je výsledný značený komplex zachycen vhodnými afinitními magnetickými částicemi [260]. V přímém režimu je afinitní ligand připojen přímo k magnetickým částicím nebo k biopolymerům (vznikne aktivní imunosorbent) vykazující afinitu k cílové sloučenině. Poté je k afinitnímu ligandu s magnetickými částicemi přidán přímo vzorek. Po inkubaci se cílové sloučeniny navážou na magnetické částice s magnetickou afinitou a vytvoří stabilní magnetické komplexy [234].

U obou technik je možné výsledný komplex magnetických částic s cílovou strukturou promýt a izolovat pomocí vhodného magnetického separátoru. Nepřímý režim vyžaduje více protilátek a více magnetických částic, proto odstranění volných protilátek může být obtížnější. Nepřímý režim je vhodný pro afinitní ligandy se špatnou afinitou k cílovým sloučeninám. Naopak přímý režim vyžaduje méně protilátek i magnetických částic, je proto rychlejší a méně obtížnější [246].

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla optimalizace podmínek kovalentní vazby specifických protilátek anti-CALR IgG na magneticky aktivních mikročasticích pro záchyt kalretikulinu, jenž lze prokázat v plodové vodě.

Dílčí kroky jsou součástí projektu, který vyvíjí senzor pro simultánní detekci tří biomarkerů (kalretikulin, pentraxin 3, interleukin 6) zánětu. Senzor by měl stavět na přednostech imunomagnetické separace a vysoké citlivosti elektrochemické detekce.

Jednotlivé kroky diplomové práce byly:

1. Kovalentní vazba nespecifických modelových protilátek na magneticky aktivní mikročastice pomocí 4 různých protokolů a jejich porovnání dle účinnosti vazby IgG.
2. Vazba specifických anti-CALR protilátek třídy IgG 2 různými protokoly na magneticky aktivní mikročastice a jejich porovnání dle účinnosti vazby.
3. Ověření funkčnosti nejúčinnějšího vytvořeného imunosorbentu pomocí specifického antigenu kalretikulinu.
4. Přehled a vyhodnocení všech dosažených výsledků a diskuze.
5. Výběr nejvhodnějšího protokolu pro přípravu imunosorbentů, jenž bude součástí multiplexního elektrochemické senzoru.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Automatické mikropipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Blokový termostat TS-100C (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Dot-Blot DHM 96 unit (Scie-Plas, Cambridge, UK) - 96 blots, 3 mm průměr
- Immun-Blot™ PVDF Membrane (for Protein Blotting, 0,2 μm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Koncentrátor Concentrator Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Laboratorní sklo
- Magnetický separátor Dynal-MPC-S (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- Mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrostríkačka (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA)
- Mikrozkmavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Miniodstředivka (Fischer Scientific, Pardubice, Česká republika)
- Odsolovací kolonky AMICON Ultra-0,5 ml, 10 K (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)
- Odsolovací kolonky AMICON Ultra-0,5 ml, 100 K (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)
- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- Plastová mikrokolonka Bio-Spin s Affi-Gel Protein A – kapacita 8–10 mg IgG/ml nosiče (agaróza); 5 cm, objem 1,2 ml (Bio-Rad, USA)
- Protein LoBind Tube 1,5 ml (Eppendorfs tubes)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Rotátor Bio RS-24 Mini (Biosan, Riga, Lotyšsko)

- Stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů ChemiDoc™ XRS+ Systém s ImageLab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Vortex V1 (Grant-bio, Cambrige, Velká Británie)
- Zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

3.2 Seznam použitých chemikálií

- Albumin from bovine serum, BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Akrylamid, C₃H₅NO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue (Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Deionizovaná voda, d.H₂O
- DL-Glyceraldehyd, C₃H₆O (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dimethylsulfoxid, DMSO, C₂H₆OS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný, K₂HPO₄ (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, NaH₂PO₄ · 2H₂O (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Dodecylsulfát sodný, SDS (Serva, Heidelberg, Německo)
- Dusičnan stříbrný, AgNO₃ (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Etanol 96%, C₂H₅OH (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Etylenglykol, C₂H₆O₂ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Formaldehyd 38%, CH₂O (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Glutaraldehyd, C₅H₈O₂ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycin, C₂H₅NO₂ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydrazid-biotin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Na₂HPO₄ · 12H₂O (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Hydroxid draselný
- Chlorid draselný, KCl (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Chlorid sodný, NaCl (Lachner, Neratovice, Česká republika)

- Jodistan sodný, NaIO₄ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyanoborohydrát sodný, NaBH₃CN (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina citronová, C₆H₈O₇ (Lachema, Brno, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková 36%, HCl (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina octová, CH₃COOH (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N, N, N, N-tetramethylenethylendiamin –TEMED 98%, C₇H₁₀N₂O₂ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N-methylenbisakrylamid (Serva, Heidelberg, Německo)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid – EDAC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný, Sulfo-NHS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Pesíran amonný –APS (Lachema a.s., Brno, Česká republika)
- Trifluoroctová kyselina –TFA (Acros Organics, Geel, Belgie)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TWEEN 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Vodný roztok amoniaku 25-29%, NH₄OH (Penta, Chrudim, Česká republika)

3.3 Použité protilátky a antigeny

- Lyofilizované nespecifické IgG z lidského séra (5 mg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lyofilizované nespecifické IgG z lidského séra (1 mg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Monoklonální myší protilátky anti-CALR IgG afinitně purifikované (Moravian Biotechnology, Brno Židenice, ČR)
- Monoklonální myší protilátky anti-CALR IgG nepurifikované, v buněčném médiu (Moravian Biotechnology, Brno Židenice, ČR)
- Králičí anti-myší IgG značená křenovou peroxidázou (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Rekombinantní lidský protein kalretikulín (host *Escherichia coli*; 90% čistota, Antibodies Online, Německo)

3.4 Typy použitých nosičů

- Magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou – HEMA-40% co-EDMA-NHNH₂, (1 mg/ 45,9 μl)
- Magnetické částice s COOH funkční skupinou – Dynabeads® My One™ Carboxylic acid (velikost částic 1 μm; 10 mg/ml; Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norsko)
- Magnetické částice modifikované Proteinem A – PURE PROTEOM™ PROTEIN A (1,5-2,5 μg/μl vazebná kapacita (králičí IgG), Milipore Corp., Billerica, MA, USA)
- Magnetické částice modifikované Streptavidinem – Dynabeads® My One™ Streptavidin C1 (10 mg/ 1 ml > 2,5 pmol protilátky/mg částic; Invitrogen, ThermoFischer, Waltham, MA, USA)
- Plastová mikrokolonka Bio-Spin s Affi-Gel Protein A – kapacita 8–10 mg IgG/ml nosiče (agaróza); 5 cm, objem 1,2 ml (Bio-Rad, USA)

3.5 Příprava použitých roztoků

Roztok pro úpravu pH dalších používaných roztoků

- **6 M HCl:** Do připravené odměrné kádinky se odpipetuje 23,5 ml destilované vody a k ní je opatrně připetováno 26,5 ml 35% HCl.

Roztoky pro SDS-PAGE

- **Roztok A:** 11,68 g akrylamidu a 0,32 g bisakrylamidu se naváží na předvážkách v digestoři a nechá se nabobtnat a rozpustit ve 12 ml destilované vody a nechá se 30 minut třepat na třepačce. Když dojde k úplnému rozpuštění, doplní se roztok na 40 ml destilovanou vodou.
- **Roztok B:** 7,26 g TRIS se naváží na předvážkách a rozpustí ve 40 ml destilované vody, aby bylo pH roztoku 8,8 je do roztoku připipetována 6 M HCl a pH je měřeno na pH metru.
- **Roztok C:** 4,84 g TRIS se naváží na předvážkách a rozpustí ve 40 ml destilované vody, aby bylo pH roztoku 6,8 je do roztoku připipetována 6 M HCl a pH je měřeno na pH metru.

- **Roztok D:** 1 g SDS se naváží na analytických vahách a rozpustí v 10 ml destilované vody.
- **Roztok E:** 0,1 persíranu amonného se naváží na analytických vahách a rozpustí v 1 ml destilované vody. Tento roztok se připravuje vždy čerstvý, vždy před vlastní přípravou gelů.
- **Elektrodotový pufr:** 3,03 g TRIS a 14,4 g glycinu se naváží na předvážkách a přidá k nim 1 g SDS, který se naváží na analytických vahách. Navážky se rozpustí v 1 l destilované vody.
- **Elektrodotový pufr 10x koncentrovanější:** 30,3 g TRIS, 144 g glycinu a 10 g SDS se rozpustí v 1000 ml destilované vody.

Použité roztoky pro barvení Coomassie Brilliant Blue

- **Barvicí roztok:** komerční roztok pro barvení: Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- **Fixační roztok:** 50 ml 99% kyseliny octové (bezvodé) + 500 ml 50% etanolu, doplněno na objem 1000 ml destilovanou vodou
- **Odbarvovací roztok:** destilovaná voda

Použité roztoky pro barvení roztokem amoniakálního stříbra

- **Fixační roztok:** 50 ml 99% ledové kyseliny octové (bezvodá) a 500 ml 50% etanolu se smíchá a na 1000 ml se doplní destilovanou vodou.
- **10% roztok glutaraldehydu:** 10 ml 50% glutaraldehydu se smísí s 40 ml destilované vody.
- **9 M hydroxid sodný:** 3,6 g hydroxidu sodného se naváží na předvážkách a rozpustí v 6 ml destilované vody, a nakonec je roztok doplněn na 10 ml destilovanou vodou.
- **20% roztok dusičnanu stříbrného:** 6 g dusičnanu stříbrného se naváží na předvážkách a rozpustí ve 30 ml destilované vody.
- **Roztok amoniakálního stříbra:** Do Erlenmayerovy baňky se odpipetuje 10 ml destilované vody, připipetuje se k ní 700 µl vodného roztoku amoniaku a 119 µl 9 M hydroxidu sodného. K takto připravenému roztoku se přititrovává

- 20% roztok dusičnanu stříbrného až do světle hnědého zákalu (bod ekvivalence). Takto připravený roztok se doplní na 50 ml destilovanou vodou.
- **Vyvolávací roztok:** 0,25 g kyseliny citronové se naváží na analytických vahách a přidá se k ní 540 μ l 0,04% formaldehydu. Celý roztok je doplněn na 500 ml destilovanou vodou.
 - **Ustalovací roztok:** 50 ml 99% kyseliny octové se smísí s 950 ml destilované vody.

Použité roztoky pro vazbu IgG molekul na magnetických částicích HEMA-40% co-EDMA-NHNH₂

- **Oxidační činidlo (0,2 M roztok jodistanu sodného):** 0,043 g jodistanu sodného se naváží na analytických vahách a rozpustí v 1 ml destilované vody. Z roztoku se odebere 60 μ l a přidá se k němu 240 μ l destilované vody. Výsledný roztok musí být 0,2 M. Roztok se připravuje vždy čerstvý.
- **Promývací a vazebný roztok (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0):** 1,4326 g hydrogenfosforečnanu sodného (zásada) se naváží na analytických vahách a rozpustí 40 ml destilované vody. 0,4680 g dihydrogenfosforečnanu sodného (kyselina) se naváží na analytických vahách a rozpustí ve 30 ml destilované vody. Z roztoku hydrogen fosforečnanu sodného se odpipetuje 30,5 ml a smísí se s 19,5 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného. Roztok se doplní na 100 ml destilovanou vodou a pH výsledného roztoku se upraví přidáním kyseliny nebo zásady.
- **Blokační roztok (0,1 M roztok DL-Glyceraldehyd v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,0):** 0,009 g DL-Glyceraldehydu se naváží na analytických vahách a rozpustí v 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,0.
- **Promývací roztok po blokaci (PBS pufr pH 7,4 s 0,05% TWEENem):** 0,003 g chloridu draselného; 0,003 g dihydrogenfosforečnanu draselného; 0,12 g chloridu sodného; 0,0435 g hydrogenfosforečnanu disodného se naváží na analytických vahách a rozpustí v 15 ml destilované vody. K roztoku se připipetují 0,03 ml 25% TWEEN.

Použité roztoky pro vazbu IgG molekul na magnetických částicích Dynabeads s funkční skupinou COOH a s Sulfo-NHS

- **Vazebný roztok (0,1 M MES pufr pH 5,0):** 0,976 g MES se naváží na analytických vahách a rozpustí v 50 ml destilované vody; pH roztoku se upraví připipetováním 1M NaOH.
- **Promývací roztok (PBS pufr pH 7,4):** 0,0203 g chloridu draselného; 0,0207 g dihydrogenfosforečnanu draselného; 0,8004 g chloridu sodného; 0,2901 g hydrogenfosforečnanu disodného se naváží na analytických vahách a rozpustí ve 100 ml destilované vody.
- **Skladovací roztok (PBS pufr s 0,05% TWEENem):** 0,003 g chloridu draselného; 0,003 g dihydrogenfosforečnanu draselného; 0,12 g chloridu sodného; 0,0435 g hydrogenfosforečnanu disodného se naváží na analytických vahách a rozpustí v 15 ml destilované vody. K roztoku se připipetují 0,03 ml 25% TWEEN.

Použité roztoky pro izolaci a vazbu IgG molekul na magnetické částice modifikované Proteinem A, jejich stabilizace pomocí Sulfo-NHS

- **Vazebný pufr a promývací (0,1 M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15 M NaCl):** 0,156 g dihydrogenfosforečnanu sodného (kyselina) se naváží na analytických vahách a rozpustí v 10 ml destilované vody. 0,716 g hydrogenfosforečnanu sodného (zásada) se naváží na analytických vahách a rozpustí ve 20 ml destilované vody. Z roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného se odpipetuje 5,6 ml a smísí se se 14,4 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného. Roztok se doplní na 40 ml destilovanou vodou, pH roztoku se upraví přidáním kyseliny nebo zásady. Po úpravě pH se k roztoku přidá chlorid sodný. 0,35 g chloridu sodného se naváží na analytických vahách a přidá se k roztoku.
- **Sít'ovadlo (2,5 μ M Sulfo-NHS):** 1,09 mg Sulfo-NHS se naváží na analytických vahách a rozpustí v 1 ml destilované vody. Výsledný roztok je 5000 μ M. Z tohoto roztoku se odpipetuje 25 μ l a přidá se k 225 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl. Výsledný roztok je 500 μ M. Z takto připraveného roztoku se odpipetuje 1,25 μ l a přidá se k 248,8 μ l 0,1 M fosfátového pufru. Tento roztok se použije pro izolaci protilátek.

Roztoky pro biotinylnaci protilátek

- **0,1 M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15 M NaCl:** 0,156 g dihydrogenfosforečnanu sodného (kyselina) se naváží na analytických vahách a rozpustí v 10 ml destilované vody. 0,716 g hydrogenfosforečnanu sodného (zásada) se naváží na analytických vahách a rozpustí ve 20 ml destilované vody. Z roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného se odpipetuje 5,6 ml a smísí se se 14,4 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného. Roztok se doplní na 40 ml destilovanou vodou, pH roztoku se upraví přidáním kyseliny nebo zásady. Po úpravě pH se k roztoku přidá chlorid sodný. 0,35 g chloridu sodného se naváží na analytických vahách a přidá se k roztoku.
- **Oxidační činidlo (0,2 M jodistanu sodného v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl):** 0,043 g jodistanu sodného se naváží na analytických vahách a rozpustí v 1 ml 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl. Z roztoku se odebere 60 µl a přidá se k němu 240 µl destilované vody. Výsledný roztok musí být 0,2 M. Roztok se připravuje vždy čerstvý.
- **Biotinylační činidlo (5 mM Hydrazid-biotin v dimethylsulfoxidu):** 0,00129 g Hydrazid-biotin se naváží na analytických vahách. Navážka se rozpustí ve 0,1 ml dimethylsulfoxidu. Z takto připraveného roztoku se odpipetuje 10 µl a přidá se k zoxidovaným protilátkám.
- **Kyanoborohydrát sodný (7 mg/1 ml PBS pufru pH 7,4):** 0,007 g kyanoborohydrátu sodného se naváží na analytických vahách a rozpustí v 1 ml PBS pufru pH 7,4.

Roztoky pro Dot-Blot analýzu

- **Ekvilibrační a promývací roztok: PBS-T (PBS pH 7,4 s 0,05% TWEEN 20):** 2 g chloridu sodného, 0,05 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,7233 g hydrogenfosforečnanu disodného a 0,05 g chloridu draselného se naváží na analytických vahách a rozpustí ve 250 ml destilované vody. Do roztoku se připipetuje 500 µl TWEEN 20.
- **Blokovací roztok (5% BSA v PBS-T):** 1 g BSA se naváží na analytických vahách a rozpustí se ve 20 ml PBS-T pufru.

- **Roztok pro ředění primárních protilátek (0,25% BSA v PBS-T):** 0,05 g BSA se zaváží na analytických vahách a rozpustí ve 20 ml PBS-T pufru.
- **Substrátový roztok: Barvení pomocí chlornaftolu (Opti-4CN™ Substrate kit, Bio-Rad):**
 - Opti-4CN™ Diluent (2,7 ml redestilované vody + 0,3 µl činidla)
 - Opti-4CN™ Substrate (60 µl na 3 ml, 1 ml na jamku)
- **Negativní kontrola:** 3 µg BSA se rozpustí v 1 ml redestilované vody nebo PBS-T pufru a 10 mM fosfátový pufr pH 7,3

Roztoky pro vazbu anti-CALR IgG molekul afinitní chromatografií na magnetických částicích s Proteinem A, mikrokoloně s Affi-Gel Protein A

- **Ekvilibrační pufr (0,1 M fosfátový pufr pH 8,0 s 0,15 M NaCl):** 0,156 g dihydrogenfosforečnanu sodného (kyselina) se naváží na analytických vahách a rozpustí v 10 ml destilované vody. 2,1488 g hydrogenfosforečnanu sodného (zásada) se naváží na analytických vahách a rozpustí ve 60 ml destilované vody. Z roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného se odpipetuje 2,65 ml a smísí se se 47,35 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného. Roztok se doplní na 100 ml destilovanou vodou, pH roztoku se upraví přidáním kyseliny nebo zásady. Po úpravě pH se k roztoku přidá chlorid sodný. 0,8766 g chloridu sodného se naváží na analytických vahách a přidá se k roztoku.
- **Regenerační pufr (0,1 M kyselina citrónová pH 3,0):** 0,5254 g kyseliny citrónové se naváží na analytických vahách a rozpustí ve 25 ml destilované vody.

Roztoky pro ověření funkčnosti připravených imunosorbentů s imobilizovanými protilátkami pomocí imunokomplexu

- **Vazebný pufr č. 1 (PBS pufr pH 7,4):** 0,0203 g chloridu draselného; 0,0207 g dihydrogenfosforečnanu draselného; 0,8004 g chloridu sodného; 0,2901 g hydrogenfosforečnanu disodného se naváží na analytických vahách a rozpustí ve 100 ml destilované vody.
- **Vazebný pufr č. 2 (TBT pufr pH 8,0):** 1,2144 g TRIS; 0,5 g BSA se naváží na analytických vahách a rozpustí v 50 ml destilované vody. K takto

připravenému roztoku se přidá 200 μ l 25% TWEEN 20, pH roztoku se upraví pomocí 6 M kyseliny chlorovodíkové.

- **Eluční roztoky:**
 - **0,05% Trifluoroctová kyselina:** 3 μ l 100% TFA se připipetují k 5997 μ l destilované vody.

3.6 Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Použité roztoky a pufrů:

- **Roztok A:** 30% směs akrylamidu a bisakrylamidu
- **Roztok B:** 1,5 M TRIS-HCl pufr pH 8,8
- **Roztok C:** 1 M TRIS-HCl pufr pH 6,8
- **Roztok D:** 10% roztok SDS
- **Roztok E:** 10% roztok persíranu amonného
- **Roztok G:** 100 mM TRIS-HCl pufr pH 6,8 s 4% SDS, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří, komerčně vzorkový pufr G
- **Elektrodový pufr:** 0,025 M TRIS; 0,192 M glycin; 0,1% SDS, pH 8,3-8,6

Pracovní postup:

Dle tabulky č. 1 se připraví 7%, 10% nebo 12% dělicí gel. Koncentrace gelu závisí na látce, která má být separována. Dle tabulky č. 1 se do připravené zkumavky napipetuje destilovaná voda, roztok A, B, D a TEMED. Zkumavka se uzavře uzávěrem a směs roztoků se opatrně promíchá kývavým pohybem. Nakonec se napipetuje roztok E, zkumavka se směsí se opět uzavře a jedenkrát se opatrně promíchá a celá směs se opatrně napipetuje mezi skla. Směs se pipetuje cca 2,5 cm pod vrchní okraj kratšího skla. Nakonec se směs přečtví destilovanou vodou. Během 20 až 30 minut by měl dělicí gel zpolymerizovat.

Po zpolymerizování dělicího gelu, se připraví 5% zaostřovací gel. Nejprve se odsaje přebytečná destilovaná voda pomocí filtračního papíru. Dle Tabulky 1 se do zkumavky napipetuje destilovaná voda, roztok A, C, D a TEMED. Zkumavka se směsí roztoků se uzavře a směs roztoků se opět opatrně promíchá kývavým pohybem. Nakonec se napipetuje roztok E, zkumavka se směsí se zase uzavře

a jedenkrát opatrně promíchá a celá směs se opatrně napipetuje mezi skla na dělicí gel, kam se pak umístí šablona s 10 jamkami. Zaostřovací gel by měl zpolymerizovat během 15 minut. Celý tento postup musí být prováděn v digestoři a v rukavicích.

Po zpolymerizování gelu se skla musí vyjmout ze stojanu a přemístí se do elektroforetické vany. Elektroforetická vana se naplní až po rysku elektrodoým pufrem. Šablona s jamkami se opatrně odstraní a vytvořené jamky se třikrát propláchnou elektrodoým pufrem.

Vzorky pro vlastní elektroforetickou separaci se připravují smísením získaného vzorku a roztoku G v poměru 1:1 a tři minuty se nechají povařit v blokovém termostatu při 100 °C. Následně se vzorky napipetují do jamek gelu pomocí Hamiltonovy mikroštríkačky. Nakonec se celá elektroforetická vana uzavře víčkem připojí se ke zdroji stejnosměrného napětí. Vlastní elektroforetická separace vzorků probíhá při konstantním napětí 180 V a 30 mA na jeden gel. Délka trvání elektroforetické separace se pohybuje kolo 45 až 55 minut a její délka trvání se odvíjí od typu dělicího gelu. Po ukončení elektroforetické separace se vana odpojí od zdroje napětí a skla se vyjmou z vany. Gel se vyndá ze skel a opatrně se umístí do Petriho misky. V Petriho misce se gel opláchne destilovanou vodou. Dále se gel obarví dle koncentrace vzorku buď pomocí Coomassie Brilliant Blue nebo roztokem amoniakálního stříbra.

Tabulka 1: Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE

	5% zaostřovací gel (ml)	7% dělicí gel (ml)	10% dělicí gel (ml)	12% dělicí gel (ml)
Destilovaná voda	1,4	2,85	2	1,68
Roztok A	0,33	1,15	1,65	2
Roztok B	-	1,25	1,25	1,25
Roztok C	0,25	-	-	-
Roztok D	0,02	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,002	0,002	0,002
Roztok E	0,02	0,5	0,05	0,05

3.6.1 Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue

Použité roztoky:

- **Barvicí roztok:** komerční roztok pro barvení: Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- **Fixační roztok:** 5% kyselina octová + 50% etanol
- **Odbarvovací roztok:** destilovaná voda

Postup:

Po elektroforetické separaci je gel přenesen do Petriho misky a je třikrát promyt destilovanou vodou, následuje fixace ve fixačním roztoku 1 hodinu při laboratorní teplotě na třepačce. Po fixaci je gel převrstven barvicím roztokem a inkubován přes noc při 4 °C. Po noční inkubaci je barvicí roztok vylit do předem připravené nádoby a gel je převrstven odbarvovacím roztokem, který je měněn dle potřeby až do doby, než dojde k odbarvení pozadí gelu.

3.6.2 Barvení gelu roztokem amoniakálního stříbra

Použité roztoky:

- **Fixační roztok:** 5% kyselina octová + 50% etanol
- Roztok 10% glutaraldehydu
- **Roztok amoniakálního stříbra:** roztok 20% dusičnanu stříbrného + roztok 9 M hydroxidu sodného a vodný roztok amoniaku
- **Vyvolávací roztok:** 0,05% kyselina citrónová + 0,04%
- **Ustalovací roztok:** 5% kyselina octová

Postup:

Po elektroforetické separaci vzorků byl gel propláchnut destilovanou vodou a fixován při 4 °C přes noc nebo 1 hodinu při laboratorní teplotě ve fixačním roztoku. Po ukončení fixace je gel rehydratován v destilované vodě (cca 30 minut) při laboratorní teplotě na třepačce. Po třicetiminutové rehydrataci je gel inkubován 30 minut v roztoku 10% glutaraldehydu při laboratorní teplotě na třepačce. Následně je gel promýván šestkrát destilovanou vodou každých 10 minut. Po ukončení promytí je gel inkubován 12-15 minut v roztoku amoniakálního stříbra při laboratorní teplotě na třepačce. Po inkubaci v roztoku amoniakálního stříbra je gel promyt destilovanou

vodou a gel je převrstven vyvolávacím roztokem. Po vyvolání je gel uskladněn v ustalovacím roztoku při 4 °C několik hodin.

3.7 Oxidace IgG molekul a vazba IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou

Použité roztoky:

- **Oxidační činidlo:** 0,02 M roztok NaIO₄ (vždy se připravuje čerstvý)
- **Etylenglykol**
- **Promývací a vazebný pufr:** 0,1 M fosfátový pufr pH 7,0
- **Blokační roztok:** 0,1 M DL-Glyceraldehyd v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,0
- **Promývací a skladovací pufr po blokaci:** PBS pufr pH 7,4

Pracovní postup pro oxidaci protilátek:

K roztoku protilátek se napipetuje roztok jodistanu sodného v množství, aby výsledný roztok měl objem 500 µl a měl koncentraci 0,02 M. Směs protilátek a oxidačního činidla se nechá inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení ve tmě. Po ukončení inkubace se oxidace ukončí napipetováním 1,5 µl etylenglykolu, celá směs se důkladně promíchá. Následuje inkubace 10 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení ve tmě. Nezareagované činidlo se odstraní pomocí MicroSpin™ G-25 kolonek. Do předem připravené zkumavky se vloží AMICON filtr a celý objem oxidovaných protilátek se napipetuje do filtru. Zkumavka se stočí 10 minut při 13 000 otáčkách (11 739 x g). Po stočení se vyjme filtr ze zkumavky a dnem vzhůru se vloží do nové zkumavky. Tato zkumavka se stočí 2 minuty při 3 500 otáčkách (3160 x g). Odsolený roztok protilátek se doplní 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,0. Z toho to roztoku se odpipetuje 10 µl a uchová se pro kontrolu na SDS-PAGE analýzu.

Pracovní postup pro vazbu IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou:

1 mg magnetických částic (HEMA 40% co-EDMA NHH₂) se promyje 5 x 1,5 ml 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,0. K těmto promytým magnetickým částicím se přidá roztok oxidovaných protilátek. Magnetické částice se nechají imobilizovat při 4 °C přes noc za mírného otáčení. Po skončení imobilizace

se magnetické částice promyjí 5 x 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,0 a vazebná frakce spolu s třemi promývacími frakcemi se uchovávají pro kontrolu na SDS-PAGE analýzu. Následně se provede blokáce napipetováním 500 µl 0,1 M DL-Glyceraldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,0. Blokáce probíhá 1 hodinu při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Nakonec je nosič promyt 4 x 1 ml PBS pufru pH 7,4 a uskladněn je v PBS pufru pH 7,4 při 4 °C.

3.8 Vazba IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou a s přidáním Sulfo-NHS

Použité roztoky:

- **Promývací pufr číslo 1:** 0,1 M MES pufr pH 5,0
- **Promývací pufr číslo 2:** PBS pufr pH 7,4
- **Skladovací pufr:** PBS pufr pH 7,4

Pracovní postup:

Protilátky se imobilizují dvou-krokovou karbodiimidovou metodou. 1 mg magnetických částic Dynabeads® My One™ Carboxylic acid se promyje 5 x 1,5 ml 0,1 M MES pufrům pH 5,0. Po promytí se k promývaným částicím přidá směs EDAC a Sulfo-NHS (7,5 mg/500 µl 0,1 M MES pufru pH 5,0 + 1,25 mg Sulfo-NHS). K aktivaci částic dojde během 10minutové inkubace při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Po aktivaci magnetických částic se nosič promyje 2 x 1,5 ml 0,1 M MES pufrům pH 5,0 a k magnetickému nosiči se přidá roztok protilátek. Před vlastním napipetováním roztoku protilátek se z něj odpipetuje 10 µl, které se uchovávají jako původní vzorek na následnou SDS-PAGE analýzu. Magnetické částice spolu s roztokem protilátek se nechají inkubovat 3 hodiny při laboratorní teplotě za mírného otáčení nebo přes noc při 4 °C za mírného otáčení. Po inkubaci se nosič s navázanými protilátkami promyje 4 x 1 ml PBS pufru pH 7,4. Nosič se uskladní v PBS pufru pH 7,4 při 4 °C. Vazebná frakce spolu se všemi promývacími frakcemi se uchovávají pro SDS-PAGE analýzu.

3.9 Vazba IgG molekul na magnetické částice modifikované Proteinem A, jejich stabilizace pomocí Sulfo-NHS

Použité roztoky:

- **Vazebný a promývací pufr:** 0,1 M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15 M NaCl
- **Sít'ovadlo:** 2,5 μ l M Sulfo-NHS
- **Zásobní roztok lidských IgG (1 mg/ml)**

Pracovní postup:

Ze zásobního roztoku magnetických částic modifikovaných Proteinem A (Pure ProteomTM Protein A Magnetic beads) se odpipetuje 100 μ l. Následně je nosič promyt 3 x 250 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl. Připraví se roztok protilátek, celkový objem roztoku je 250 μ l. 50 μ l protilátek se smísí s 200 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl a odebere se z něj 10 μ l jako původní vzorek protilátek pro další SDS-PAGE analýzu. Následně se roztok protilátek napipetuje k magnetickým částicím a probíhá hodinová inkubace při laboratorní teploty za mírného otáčení.

Po inkubaci se odebere vazebná frakce (uchová se pro další SDS-PAGE analýzu) a magnetické částice se promyjí 5 x 250 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl (první tři promývací frakce se uchovávají pro další SDS-PAGE analýzu). Po promytí se k magnetickým částicím napipetuje 250 μ l 2,5 μ M Sulfo-NHS. Následuje hodinová inkubace při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Po inkubaci se magnetické částice promyjí 5 x 250 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl (první dvě frakce se uchovávají pro další SDS-PAGE analýzu).

3.10 Oxidace IgG protilátek pomocí jodistanu sodného a jejich biotinylace pomocí Hydrazid-biotinu

Použité roztoky pro oxidaci protilátek:

- **0,2 M NaIO₄ v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl**
- **0,1 M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15 M NaCl**
- **Zásobní roztok lidských IgG (1 mg/ml)**

Pracovní postup pro oxidaci protilátek:

K oxidaci a následné biotinylnaci se použije 200 µg lidských IgG. Připraví se roztok jodistanu sodného a napipetuje se v množství tak, aby výsledný roztok měl objem 500 µl a koncentraci 0,02 M (300 µl roztoku jodistanu sodného a 200 µl roztoku IgG). Roztok se nechá 30 minut inkubovat při laboratorní teplotě za mírného otáčení a ve tmě. Po ukončení inkubace se oxidace zastaví napipetováním 1,5 µl etylenglykolu. Roztok se promíchá, probíhá 10minutová inkubace za mírného otáčení při laboratorní teplotě a ve tmě. Po inkubaci se roztok protilátek a jodistanu sodného zakoncentruje na AMICON filtrech. Do zkumavky se vloží filtr, do něj se napipetuje celý objem roztoku protilátek a zkumavka s filtrem se stočí při 13 000 otáčkách (11 739 x g) 10 minut. Po stočení se ze zkumavky vyjme filtr a obráceně se vloží do čisté zkumavky. Zkumavka s filtrem se opět stočí při 3 500 otáčkách (3160 x g) 2 minuty. Po zakoncentrování se roztok protilátek doplní 200 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl. Z takto připraveného roztoku se odebere 10 µl jako původní vzorek a použije se na kontrolu SDS-PAGE.

Použité roztoky pro biotinylnaci protilátek:

- **Biotinylnační činidlo:** 5 mM Hydrazid-biotin v dimethylsulfoxidu
- **Kyanoborohydrát sodný** (7 mg/1 ml PBS pufru pH 7,4)

Pracovní postup pro biotinylnaci protilátek:

Připraví se zásobní roztok Hydrazid-biotin o 50 mM koncentraci. Navážka Hydrazid-biotinu se rozpustí ve 100 µl dimethylsulfoxidu. Z takto připraveného roztoku se odpipetuje 10 µl do 200 µl roztoku oxidovaných protilátek, aby měl výsledný roztok protilátek koncentraci 5 mM Hydrazid-biotin. Roztok oxidovaných protilátek s Hydrazid-biotinem se nechá inkubovat 1 hodinu a 15 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení a ve tmě. Po ukončení inkubace se k roztoku protilátek přidají 2 µl kyanoborohydrátu sodného. Roztok s protilátkami se promíchá a probíhá inkubace 30 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení a ve tmě. Po ukončení inkubace se roztok protilátek zakoncentruje na AMICON filtrech. Do zkumavky se vloží filtr, do něj se napipetuje celý objem roztoku protilátek a zkumavka s filtrem se stočí při 13 000 otáčkách (11 739 x g) 10 minut. Po stočení se ze zkumavky vyjme filtr a obráceně se vloží do čisté, předem připravené, zkumavky. Zkumavka s filtrem se opět stočí při 3 500 otáčkách (3160 x g) 2 minuty.

Po zakoncentrování se roztok protilátek doplní 200 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl.

3.11 Vazba biotinylovaných IgG molekul na magnetické částice modifikované Streptavidinem

Použité roztoky:

- **PBS pufr pH 7,4**

Pracovní postup:

Ze zásobního roztoku magnetických částic (Dynabeads® My One™ Streptavidin C1) se odebere 100 μ l. Částice se promyjí 3x 1 ml PBS pufru pH 7,4. 25 μ g (50 μ l) biotinylovaných protilátek se doplní 950 μ l PBS pufrém pH 7,4 a z tohoto roztoku se odpipetuje 10 μ l jako původní vzorek na kontrolu na SDS-PAGE. Roztok protilátek se přidá k promytým magnetickým částicím. Magnetické částice s protilátkami se inkubují 30 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení ve tmě. Po ukončení inkubace se magnetické částice promyjí 5x 1 ml PBS pufru a vazebná a tři promývací frakce se uchovávají pro kontrolu na SDS-PAGE. Nosič se skladuje v PBS pufru pH 7,4 při 4 °C.

3.12 Dot-blot analýza

Použitá membrána:

- **Immun-Blot™ PVDF Membrane (for Protein Blotting, 0,2 μ m, Bio-Rad)**

Použité roztoky:

- **Ekvilibrační a promývací roztok:** PBS-T (PBS pH 7,4 s 0,05% TWEEN 20)
- **Blokovací roztok:** 5% BSA v PBS-T
- **Roztok pro ředění primárních protilátek:** 0,25% BSA v PBS-T
- **Substrátový roztok:** Barvení pomocí chlornaftolu (Opti-4CN™ Substrate kit, Bio-Rad)
 - Opti-4CN™ Diluent (2,7 ml redestilované vody + 0,3 μ l činidla)
 - Opti-4CN™ Substrate (60 μ l na 3 ml, 1 ml na jamku)
- **Negativní kontrola:**

- 3 μg BSA na 1 ml (v redestilované vodě nebo PBS-T) a 10 mM fosfátový pufr pH 7,3

Použité chemikálie:

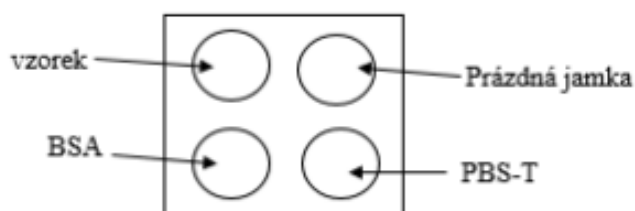
- Monoklonální myší protilátky anti-CALR IgG afinitně purifikované (Moravian Biotechnology, Brno Židenice, ČR)
- Monoklonální myší protilátky anti-CALR IgG nepurifikované, v buněčném médiu (Moravian Biotechnology, Brno Židenice, ČR)
- Rekombinantní lidský protein kalretikulin (host *Escherichia coli*; 90% čistota, Antibodies Online, Německo)
- Konjugát: Králičí anti-myší IgG protilátky proti kalretikulinu značené křenuvou peroxidázou (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Použité zařízení:

- **Dot-Blot DHM 96 unit (Scie-Plas, Cambridge, UK) - 96 blots, 3 mm průměr**

Pracovní postup:

Nejprve se provede ekvibrace membrány ve 100% metanolu po dobu jedné minuty. Hned poté se membrána přenesse na aparaturu, kde se vytvoří vakuum. Následuje druhá ekvibrace membrány, kdy je pipetou nadávkováno 100 μl PBS-T do každé jamky membrány, promytí membrány je vhodné alespoň dvakrát opakovat. Poté se na membránu nanesou vzorky (3 μg) a negativní kontroly (2 μg BSA v PBS-T pufru a 10 mM fosfátový pufr pH 7,3). Negativní kontroly se nanášejí vždy ve 100 μl na jamku (Obrázek 11). BSA v PBS-T pufru a 10 mM fosfátový pufr pH 7,3 slouží jako nespecifický antigen pro ověření případné nespecifické sorpce protilátek. Po nanesení vzorků se jamky s nanešenými vzorky jednorázově promyjí 100 μl PBS-T, aby došlo k lepšímu zatažení vzorků do PVDF membrány.



Obrázek 11: Schéma nanášení vzorků do jamek

Následně se vyjme membrána z aparatury a nechá se uschnout na vzduchu. Po uschnutí membrány se provede její blokace 1 ml blokačního roztoku po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě za stálého třepání na třepačce. Po ukončení blokace se membrány rychle promyjí 3 x 1 ml promývacího pufru. Poté se na membrány aplikuje primární (testovaná) protilátka v ředění 1:1000 (1 µg Ab/1000 µl 0,25 % BSA v PBS-T). Po inkubaci se promyje membrána 3 x 3 ml PBS-T pufru rychle a poté se membrána promyje 3 x 3 ml PBS-T pufrům vždy s inkubací 5 minut při laboratorní teplotě za stálého třepání na třepačce. Po posledním promytí se na membránu přidá konjugát (sekundární protilátka značená křenovou protilátkou) ředění 1:1000. Membrána s konjugátem se inkubuje 1 hodinu při laboratorní teplotě za stálého třepání na třepačce. Nakonec je po inkubaci přidán substrátový roztok Opti-4CN™ Diluen a Opti-4CN™ Substrate (roztok se připraví dle návodu od výrobce). V substrátovém roztoku je membrána inkubována 30 minut při laboratorní teplotě za stálého třepání na třepačce. Po poslední inkubaci se membrána vyhodnotí denzitometricky na ChemiDoc™ XRS + System a pomocí ImageLab™ softwaru.

3.13 Vazba anti-CALR IgG molekul na nosič s agarózou a Proteinem A

Použité roztoky:

- **Ekvilibrační pufr:** 0,1 M fosfátový pufr pH 8,0 + 0,15 M NaCl
- **Regenerační roztok:** 0,1 M kyselina citrónová pH 3,0

Pracovní postup:

Mikrokolonka s Proteinem A se promyje 10 x 1 ml ekvilibračního pufru. Poté se na kolonku napipetuje 1 ml vzorku anti-CALR IgG. Z tohoto vzorku se odpipetuje 10 µl a uchovají se jako původní vzorek pro SDS-PAGE analýzu. Jakmile dosáhne hladina vzorku hladiny nosiče, převrství se vzorek anti-CALR IgG malým množstvím ekvilibračního pufru (zatažení vzorku). Poté se kolona promyje 6 x 1 ml ekvilibračního pufru. Čtyři frakce jsou uchovány pro SDS-PAGE analýzu. Kolona je po izolaci anti-CALR IgG regenerována 5 x 1 ml regeneračního pufru. Poté je kolona promyta 5 x 1 ml ekvilibračního pufru a uchována v lednici při 4 °C.

3.14 Vazba anti-CALR IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou a s přidáním Sulfo-NHS

Použité roztoky:

- **Promývací pufr číslo 1:** 0,1 M MES pufr pH 5,0
- **Promývací pufr číslo 2:** PBS pufr pH 7,4
- **Skladovací pufr:** PBS pufr pH 7,4

Pracovní postup:

Protilátky se imobilizují dvou-krokovou karbodiimidovou metodou. 1 mg magnetických částic Dynabeads® My One™ Carboxylic acid se promyje 5 x 1,5 ml 0,1 M MES pufrém pH 5,0. Po promytí se k promyтым částicím přidá směs EDAC a Sulfo-NHS (7,5 mg/500 µl 0,1 M MES pufru pH 5,0 + 1,25 mg Sulfo-NHS). K aktivaci částic dojde během 10minutové inkubace při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Po aktivaci magnetických částic se nosič promyje 2 x 1,5 ml 0,1 M MES pufrém pH 5,0 a k magnetickému nosiči se přidá roztok anti-CALR IgG klon 5.1. Před vlastním napipetováním roztoku protilátek se z něj odpipetuje 10 µl, které se uchovají jako původní vzorek na následnou SDS-PAGE analýzu. Magnetické částice spolu s roztokem protilátek se nechají inkubovat 3 hodiny při laboratorní teplotě za mírného otáčení nebo přes noc při 4 °C za mírného otáčení. Po inkubaci se nosič s navázanými protilátkami promyje 4 x 1 ml PBS pufru pH 7,4. Nosič se uskladní v PBS pufru pH 7,4 při 4 °C. Všechny promývací frakce se uchovají pro SDS-PAGE analýzu.

3.15 Ověření funkčnosti připraveného imunosorbentu s imobilizovanými anti-CALR IgG pomocí imunokomplexu

Použité roztoky:

- **Vazebný a promývací pufr č. 1:** PBS pufr pH 7,4
- **Vazebný a promývací pufr č. 2:** TBT pufr pH 8,0
- **Eluční roztok:** 0,05% TFA pH 2,3

Pracovní postup:

Připravený imunosorbent (1 mg magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou s navázanými anti-CALR IgG klon 5.1) byl promyt 3 x 0,5 ml PBS pufrem pH 7,4. K promytému imunosorbentu se přidá 1 µg antigenu kalretikulinu a směs se promíchá. Směs antigenu s imunosorbentem se nechá 1 hodinu inkubovat při laboratorní teplotě za mírného otáčení na rotátoru. Po inkubaci se ze směsi odebere supernatant s nevyvázaným antigenem (tzv. frakce po vazbě). Vazebná frakce se musí zakoncentrovat na AMICON filtrech 100K/10K na objem 20 µl. Do zkumavky se vloží filtr, do něj se napipetuje celý objem roztoku a zkumavka s filtrem se stočí při 13 000 otáčkách (11 739 x g) 10 minut. Po stočení se ze zkumavky vyjme filtr a obráceně se vloží do čisté, předem připravené, zkumavky. Zkumavka s filtrem se opět stočí při 3 500 otáčkách (3160 x g) 2 minuty. Po inkubaci se nosič promyje 3 x 0,5 ml PBS pufrem pH 7,4.

Následuje eluce. Eluce probíhá u nosiče pomocí 0,05% TFA pH 2,3. Samotná eluce probíhala 2 x 15 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení na rotátoru. Ve chvíli, kdy je eluce ukončena se nosič promyje 3 x 0,5 ml PBS pufrem pH 7,4. Získané eluce se zakoncentrují na AMICON filtrem 100K/10K na objem 20 µl. Zakoncentrované vazebné frakce spolu se všemi zakoncentrovanými elucemi se uchovají pro další SDS-PAGE analýzu. Všechny zakoncentrované eluce se uchovají pro další SDS-PAGE analýzu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit funkční imunosorbent pro vazbu antigenu kalretikulinu. Na modelových protilátkách se provedly první experimenty. Modelovými protilátkami byly lidské IgG protilátky izolované ze séra zdravých dárců. Pro vazbu modelových IgG protilátek byly vybrány 4 různé způsoby vazby s různými typy magnetických částic.

Podle nejlepší vazby modelových IgG protilátek na magnetické částice se pak vybral nejvhodnější nosič pro přípravu imunosorbentu s anti-CALR IgG. Funkčnost takového imunosorbentu byla ověřena pomocí modelového vzorku s přidavkem rekombinantního proteinu kalretikulinu.

4.1 Příprava imunosorbentu se 4 různými typy nosičů

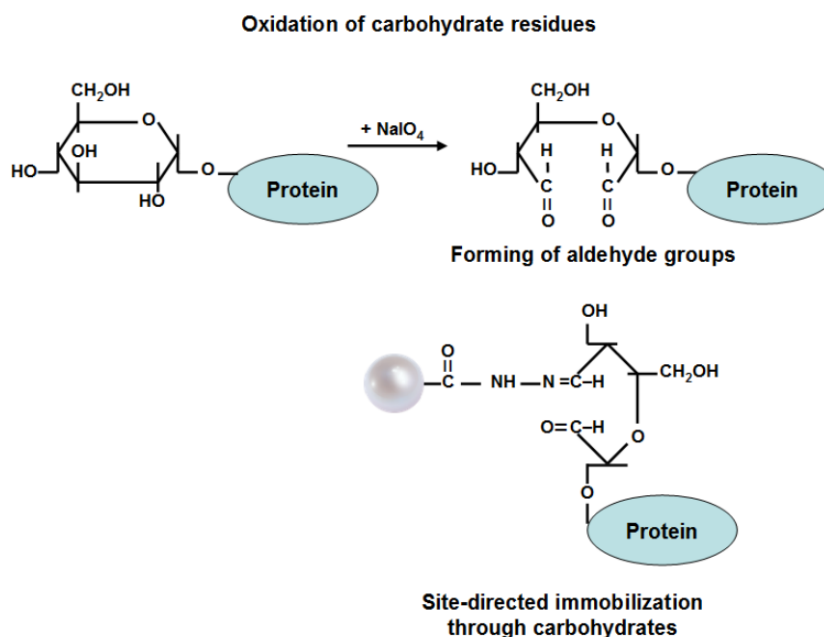
Pro vazbu modelových IgG protilátek byly použity čtyři typy nosičů:

- Magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou – HEMA-40% *co*-EDMA-NHNH₂ (1 mg/45,9 μl)
- Magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou – Dynabeads® My One™ Carboxylic acid (velikost částic 1 μm; 10 mg/ml; Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norsko)
- Magnetické částice modifikované Proteinem A – PURE PROTEOM™ PROTEIN A (1,5-2,5 μg/μl vazebná kapacita (králičí IgG), Milipore Corp., Billerica, MA, USA)
- Magnetické částice modifikované Streptavidinem – Dynabeads® My One™ Streptavidin C1 (10 mg/ 1 ml > 2,5 pmol protilátky/mg částic; Invitrogen, ThermoFischer, Waltham, MA, USA).

Dle funkční skupiny na povrchu magnetických částic byl vybrán odpovídající způsob imobilizace molekul IgG. U prvních dvou typů mikročástic se jednalo o tvorbu kovalentní vazby, v případě druhých dvou nosičů se jednalo o tvorbu vazeb nekovalentních.

4.1.1 Vazba IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou

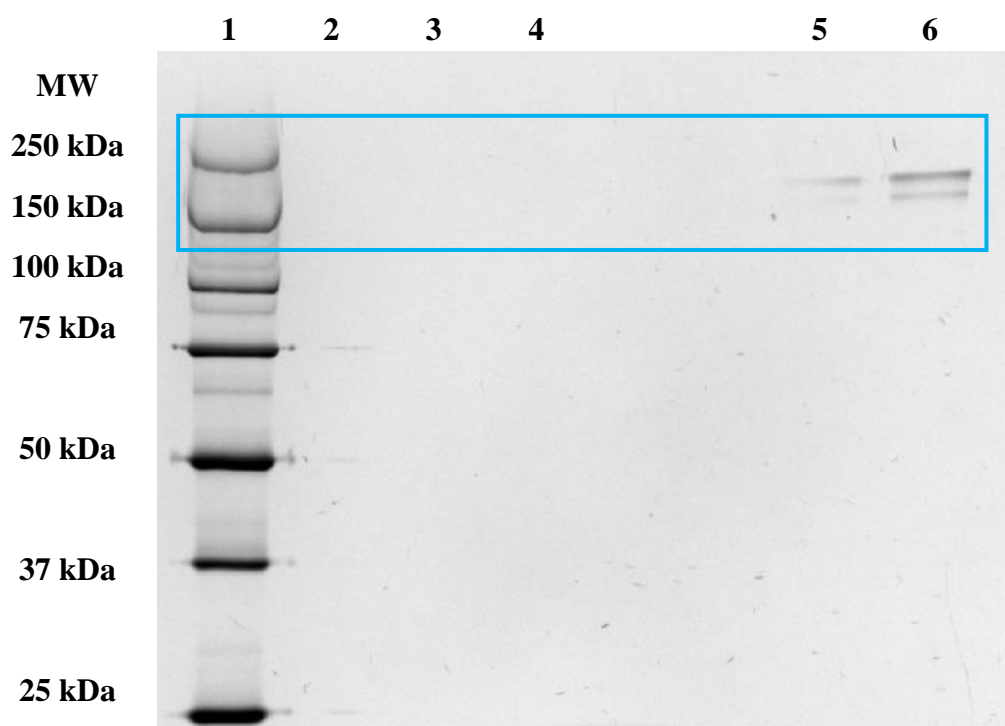
Prvním použitým typem nosiče byly magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou. Díky oxidaci se na volných karbohydrátových řetězcích vytvoří aldehydické skupiny, které reagují s hydrazidem. (Obrázek 12) [254].



Obrázek 12: Schéma orientované imobilizace ligandů přes karbohydráty na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou, převzato z [261]

Oxidace modelových lidských IgG protilátek proběhla za pomoci jodistanu sodného a následná vazba modelových lidských IgG molekul na magnetické částice byla provedena podle návodu, který byl popsán v kapitole 3.7.

K vazbě lidských IgG molekul byl použit 1 mg magnetických částic s hydrazidovou funkční skupinou (HEMA-40% *co*-EDMA-NHNH₂). K vazbě bylo použito 50 µg lidských IgG molekul. Pomocí SDS-PAGE byla zkontrolována vazba lidských IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou. Na 10% gel byl napipetován původní vzorek IgG, vazebná frakce a první 3 promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0). Gel byl obarven roztokem amoniakálního stříbra a vyhodnocen na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy je zobrazen na Obrázku 13.



Obrázek 13: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby modelových IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou

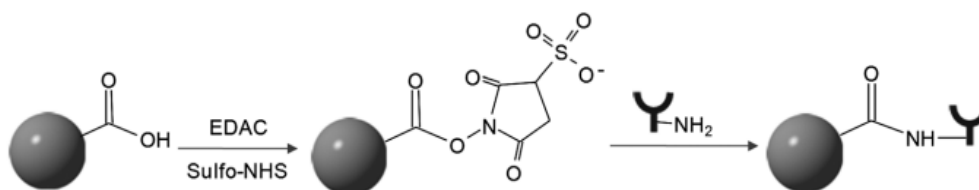
1 – standard molekulových hmotností, 2–4 promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0), 5 – vazebná frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0), 6 – původní vzorek modelových lidských IgG protilátek; polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

V jamce č. 1 jsou viditelné proužky směsi proteinů o známých molekulových hmotnostech. Do jamek č. 2, 3, 4 byly napipetovány aliquoty promývacích frakcí. Do jamky č. 5 byla napipetována frakce vazebného roztoku s koncentrací IgG protilátek 50 µg, v jamce č. 6 se nachází výrazný proužek odpovídající původnímu vzorku lidských IgG protilátek. Dle intenzity zabarvení a šíře proužků byla pomocí ImageLab stanovena účinnost vazby a to 77 %. Lze se domnívat, že pouze větší část IgG molekul byla oxidována a aktivována pro následnou kovalentní vazbu. Na druhou stranu se jedná o tzv. orientovanou vazbu, kdy nejprve dojde k oxidaci –OH skupiny sacharidů, tvořících glykosidické řetězce na Fc části IgG.

Tento způsob vazby byl opakován minimálně 5x, vždy s přibližně stejným výsledkem. Dosažené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 70 do 77 %, tedy průměrná účinnost vazby byla 73 %.

4.1.2 Vazba IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou

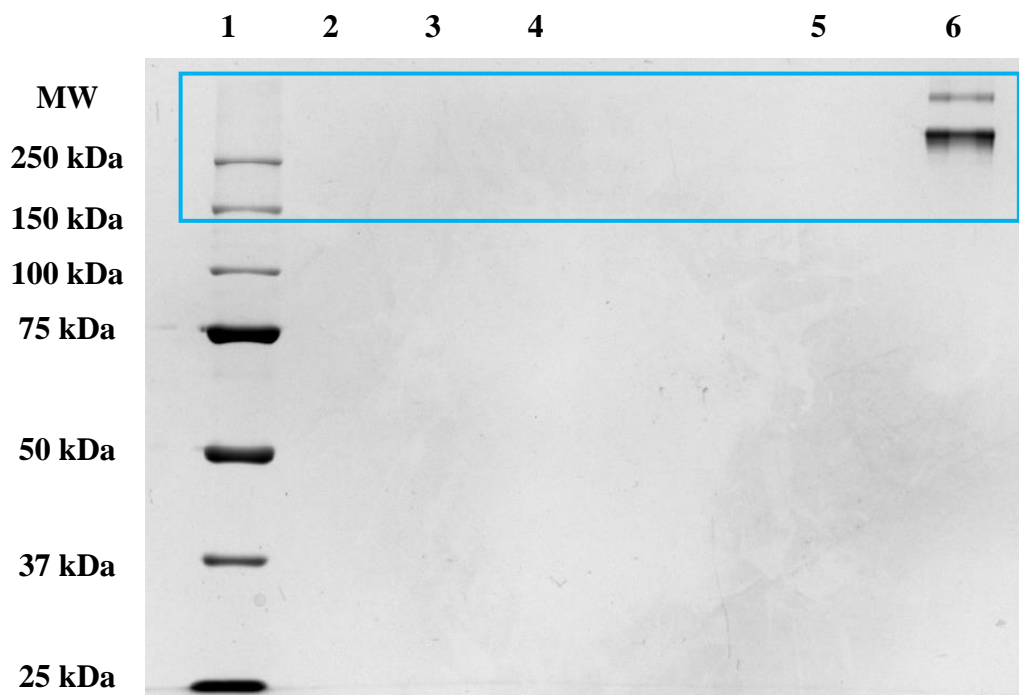
Druhým nosičem byly magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou. Vazba modelových lidských IgG molekul na magnetické částice proběhla dvoukrokovou karbodiimidovou metodou s přidavkem Sulfo-NHS (síťovadlo) [254]. V prvním kroku se aktivovala karboxylová funkční skupina na magnetických částicích pomocí EDAC karbodiimidu s Sulfo-NHS a vznikl esterový meziprodukt. Ve druhém kroku došlo k reakci esterového meziproduktu s aminovou funkční skupinou na IgG protilátkách a vznikla amidová vazba (Obrázek 14).



Obrázek 14: Aktivace magnetických částic pomocí EDAC a Sulfo-NHS, převzato z [244]

Vazba modelových lidských IgG molekul na povrch magnetických částic byla provedena podle návodu, který byl popsán v kapitole 3.8.

K vazbě modelových IgG molekul byl použit 1 mg magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou (Dynabeads® My One™ Carboxylic acid). K vazbě bylo použito 50 µg modelových lidských IgG molekul. Pomocí SDS-PAGE byla zkontrolována vazba IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou. Na 10% gel byl napipetován původní vzorek IgG, vazebná frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0) a první 3 promývací frakce (PBS pufr pH 7,4). Gel byl obarven roztokem amoniakálního stříbra a vyhodnocen na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy je zobrazen na Obrázku 15.



Obrázek 15: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby modelových IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou

1 – standard molekulových hmotností, 2–4 promývací frakce (0,1 M PBS pufr pH 7,4), 5 – vazebná frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 6 – původní vzorek modelových lidských IgG protilátek; polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

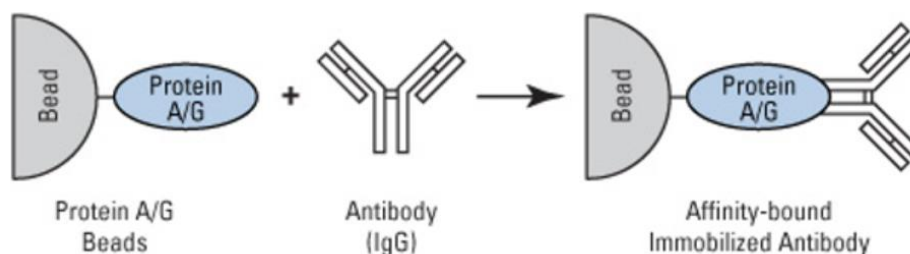
V jamce č. 1 jsou viditelné proužky odpovídající směsi proteinů o známých molekulových hmotnostech. Do jamek č. 2, 3, 4 byly napipetovány aliquoty promývacích frakcí. Do jamky č. 5 byla napipetovaná vazebná frakce roztoku s koncentrací IgG protilátek 50 μg , v jamce č. 6 se nachází výrazný proužek odpovídající původnímu vzorku lidských IgG protilátek. Dle absence proužků v roztoku po vazbě i v promývacích frakcích byla pomocí ImageLab stanovena účinnost vazby lidských IgG molekul na 100 %.

Vazba IgG molekul na magnetické částice byla tzv. neorientovaná. To znamená, že i když se navázaly všechny IgG molekuly na magnetické částice, stále to nemusí znamenat, že na každou molekulu IgG se budou vázat dvě molekuly antigenu. $-\text{NH}_2$ skupiny se vyskytují podél celých řetězců, a tak se může stát, že vazba takové funkční skupiny v některých místech IgG stéricky zabrání vazbě antigenu do vazebného místa protilátky.

Tento způsob vazby byl opakován minimálně 3x, vždy s přibližně stejným výsledkem. Dosažené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 98 do 100 %, tedy průměrná účinnost vazby byla 99 %.

4.1.3 Vazba IgG molekul na magnetické částice s modifikovaným Proteinem A

Jako třetí nosič byly použity magnetické částice s kovalentně vázaným Proteinem A. Protein A je imobilizovaný a izoluje se z bakterie *Staphylococcus aureus*. Protein A rozpoznává a specificky interaguje s těžkými řetězci Fc oblastí IgG protilátky. Díky tomu může dojít k orientaci imobilizované protilátky tak, že jsou místa pro vázající se antigen nasměrována ven. Výsledek této vazby je orientovaná kovalentní vazba (Obrázek 16) [238]. Je-li Protein A navázán na magnetické částice, tak lze vazbou Fc částí IgG na každou subjednotku Proteinu A získat a jeho vazba vytvoří s IgG molekulami imunosorbent s orientovaně vázanými molekulami IgG. Všechny IgG molekuly jsou stejně kovalentně vázány a nedochází ke sterickým zábranám v prostoru vazebných míst těchto protilátek. Díky orientované imobilizaci protilátek IgG je zvyšována vazebná kapacita imunosorbentu [262].

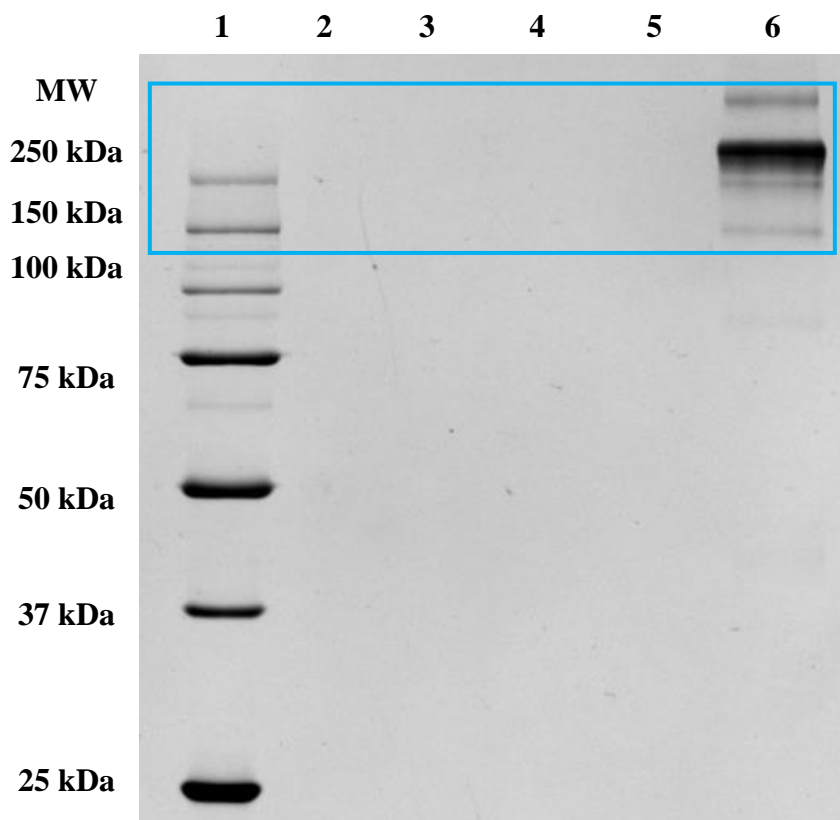


Obrázek 16: Schéma konjugace protilátky zajištěné Proteinem A nebo G, převzato z [263]

Vazba modelových lidských IgG molekul na povrch magnetických částic byla provedena podle návodu, který byl popsán v kapitole 3.9.

K vazbě modelových IgG molekul byl použit 1 mg magnetických částic PURE PROTEOM™ PROTEIN A Magnetic Beads. K vazbě bylo použito 50 µg modelových lidských IgG molekul. Aby bylo možné zajistit co největší stabilitu, byl použit Sulfo-NHS jako síťovadlo. Pomocí SDS-PAGE byla zkontrolována vazba lidských IgG

molekul na magnetické částice modifikované Proteinem A. Na 10% gel byl napipetován původní vzorek IgG, vazebná frakce a první 3 promývací frakce (0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl). Gel byl obarven roztokem amoniakálního stříbra a vyhodnocen na stanici ChemiDocTMXRS+System se softwarem ImageLabTM. Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy je zobrazen na Obrázku 17.



Obrázek 17: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby modelových IgG molekul na magnetické částice modifikované Proteinem A

1 – standard molekulových hmotností, 2–4 promývací frakce (0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl), 5 – vazebná frakce (0,1 M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15 M NaCl), 6 – původní vzorek modelových lidských IgG protilátek; polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

V jamce č. 1 jsou viditelné proužky odpovídající směsi proteinů o známých molekulových hmotnostech. Do jamek č. 2, 3, 4 byly napipetovány aliquoty promývacích frakcí. Do jamky č. 5 byla napipetovaná vazebná frakce roztoku s koncentrací IgG protilátek 50 μ g, v jamce č. 6 se nachází výrazný proužek odpovídající původnímu vzorku lidských IgG protilátek. Dle absence proužků v roztoku po vazbě i v promývacích frakcích byla pomocí ImageLab stanovena účinnost vazby lidských IgG molekul na 100 %.

Vazba IgG molekul na magnetické částice byla tzv. neorientovaná. To znamená, že i když se navázaly všechny IgG molekuly na magnetické částice, stále to nemusí znamenat, že na každou molekulu IgG se budou vázat dvě molekuly antigenu. $-NH_2$ skupiny se vyskytují podél celých řetězců, a tak se může stát, že vazba takové funkční skupiny v některých místech IgG stéricky zabrání vazbě antigenu do vazebného místa protilátky.

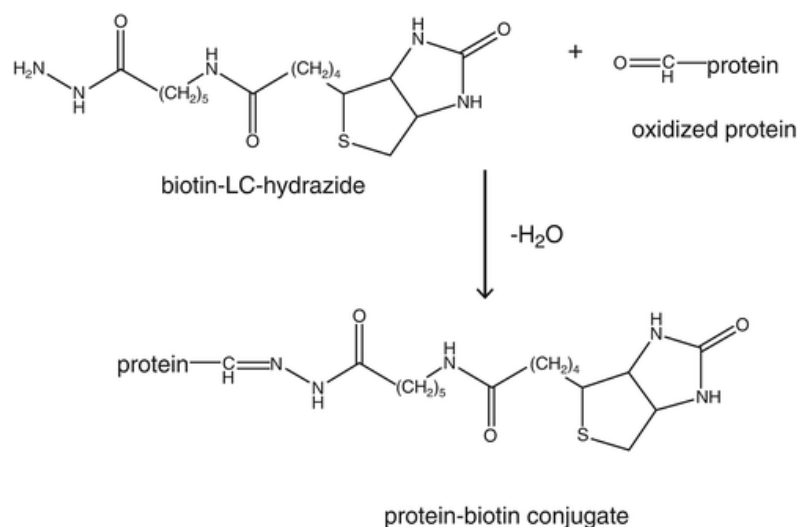
Tento způsob vazby byl opakován minimálně 2x, vždy s přibližně stejným výsledkem. Dosažené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 98 do 100 %, tedy průměrná účinnost vazby byla 99 %.

4.1.4 Vazba IgG molekul na magnetické částice modifikované Streptavidinem

Posledním typem nosiče byly magnetické částice s kovalentně vázaným Streptavidinem. Jednalo se o magnetické částice Dynabeads® My One™ Streptavidin C1.

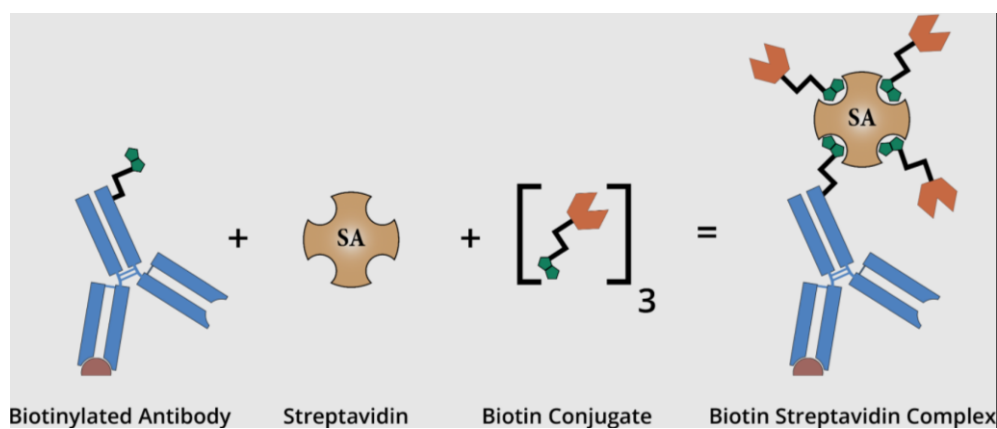
Biotinylace IgG molekul

Před vlastní vazbou IgG molekul byly IgG protilátky oxidovány jodistanem sodným a biotinylovány Hydrazid-biotinem. Hydrazid-biotin se váže na aldehydy, které vznikly oxidací OH skupin na glykosidických řetězcích a vznikne stabilní hydrazonová vazba (Obrázek 18) [244,254]. Streptavidin je protei izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii* a vykazuje vysokou afinitu k biotinu, což je využíváno právě pro vazbu ligandů na pevnou fázi.



Obrázek 18: Schéma biotinylace oxidované IgG protilátky pomocí Hydrazid-biotin, převzato z [264]

Protože je velká afinita mezi Streptavidinem a biotinem, je možná vazba mezi těmito dvěma látkami. Vazba mezi povrchem magnetických částic s protiláčkami je orientovaná (Obrázek 19) [244,254].



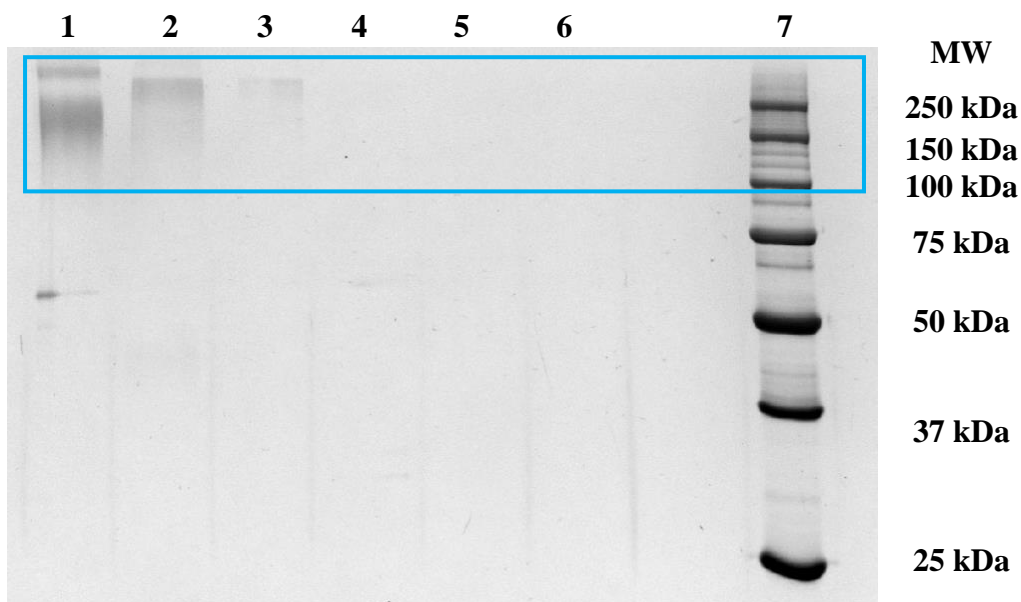
Obrázek 19: Schéma vazby biotinylovaných IgG molekuly na Streptavidin, převzato z [265]

Pro biotinylace bylo použito 200 µg modelových lidských IgG protilátek. Takové množství protilátek bylo použito, protože se předpokládala 50% ztráta při krocích jako jsou oxidace IgG protilátek, jejich biotinylace a zakoncentrování. Oxidace a biotinylace proběhly podle pracovního postupu popsaného v kapitole 3.10.

Vazba biotinylovaných IgG molekul se Streptavidinem na magnetické částice

K vazbě modelových IgG molekul byl použit 1 mg magnetických částic Dynabeads® My One™ Streptavidin C1. K vazbě bylo použito 25 µg biotinylovaných lidských IgG molekul. Pomocí SDS-PAGE byla zkontrolována vazba IgG na magnetické částice modifikované Streptavidinem.

Následná vazba biotinylovaných lidských IgG molekul proběhla podle pracovního postupu, který je popsán v kapitole 3.11. Na 12% gel byl napipetován původní vzorek oxidovaných IgG protilátek před biotinylací, původní vzorek biotinylovaných IgG po oxidaci, vazebná frakce a první 3 promývací frakce (PBS pufr pH 7,4). Gel byl obarven roztokem amoniakálního stříbra a vyhodnocen na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy je zobrazen na Obrázku 20.



Obrázek 20: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby modelových IgG molekul na magnetické částice modifikované Streptavidinem.

1 – původní vzorek oxidovaných lidských IgG před biotinylací (0,5 µg na jamku), 2 – původní vzorek biotinylovaných lidských IgG po oxidaci (0,5 µg na jamku), 3 – vazebná frakce (PBS pufr pH 7,4), 4–6 promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), 7– standard molekulových hmotností, 12% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

V jamce č. 1 jsou viditelné proužky odpovídající oxidovaným IgG protilátkám před biotinylací. V jamce č. 2 jsou viditelné proužky, které odpovídají biotinylovaným IgG protilátkám, což odpovídá posunu pozice proužků směrem k vyšší molekulové hmotnosti. Do jamky č. 3 byla napipetovaná vazebná frakce

biotinylovaných IgG protilátek. Do jamek č. 4, 5, 6 byly napipetovány aliquoty promývacích frakcí. V jamce č. 7 byla napipetovaná směs proteinů o známých molekulových hmotnostech. Dle intenzity zabarvení a šíře proužků byla pomocí ImageLab stanovena účinnost vazby lidských IgG molekul na 74 %. Účinnost vazby modelových hIgG na tyto magnetické částice je nižší než u předchozích třech nosičů. Posun molekulové hmotnosti po biotinylacii je zřejmý, je tedy možné se domnívat, že došlo k úspěšné vazbě biotinylovaných IgG molekul na nosič se Streptavidinem.

Tento způsob vazby byl opakován minimálně 6x, vždy s přibližně stejným výsledkem. Dosažené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 68 do 74 %, tedy průměrná účinnost vazby byla 71 %.

4.2 Vyhodnocení nejlepší vazby IgG molekul na různé typy nosičů

Tabulka 2 shrnuje všechny použité nosiče a účinnost vazby s jakou se vázaly modelové IgG molekuly. Podle Tabulky 2 je patrné, že nejlépe se vázaly modelové IgG molekuly na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (Dynabeads® My One™ Carboxylic acid) a na magnetické částice modifikované Proteinem A (PURE PROTEOM™ PROTEIN A). Na oba tyto nosiče se modelové protilátky vázaly se 100% účinností, proto byly tyto nosiče použity i pro přípravu imunosorbentů se specifickými anti-CALR IgG.

Zbylé dva nosiče s hydrazidovou funkční skupinou a modifikované Streptavidinem neměly tak vysokou účinnost vazby IgG molekul jako předchozí dva. Na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou (HEMA-40% *co*-EDMA-NHNH₂) se modelové lidské IgG molekuly vázaly se 77% účinností. Na magnetické částice modifikované Streptavidinem (Dynabeads® My One™ Streptavidin C1) se modelové IgG molekuly vázaly se 74% účinností. Ani jeden z těchto nosičů nebyl použit pro další experimenty s anti-CALR IgG, protože u těchto způsobů vazby docházelo k významným ztrátám IgG protilátek z důvodů oxidace a biotinylace.

Tabulka 2: Přehled použitých nosičů a přehled vazeb modelových hIgG protilátek

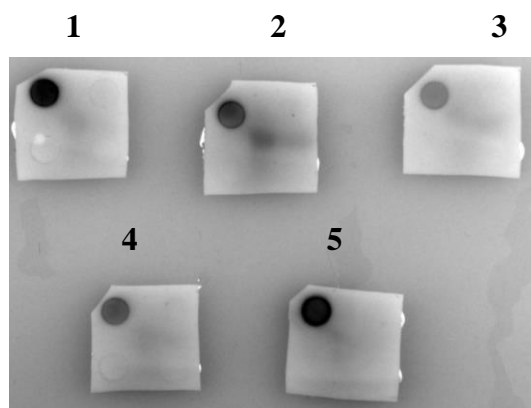
Nosič	Množství hIgG vázané na nosič	Předpokládané množství hIgG na 1 mg nosiče	Látkové množství hIgG molekul na 1 mg nosiče	Počet molekul hIgG navázaných na 1 mg nosiče
*MNP HEMA-40% co-EDMA-NHNH ₂	50 µg hIgG	38,62 µg hIgG= 77,24 % hIgG	2,57*10 ⁻¹⁰ mol hIgG	1,55*10 ¹⁴ molekul hIgG
*MNP – Dynabeads® My One™ Carboxylic acid	50 µg hIgG	50 µg hIgG= 100 % h IgG	3,33*10 ⁻¹⁰ mol hIgG	2,01*10 ¹⁴ molekul hIgG
*MNP PURE PROTEOM™ PROTEIN A	50 µg hIgG	50 µg hIgG= 100 % h IgG	3,33*10 ⁻¹⁰ mol hIgG	2,01*10 ¹⁴ molekul hIgG
*MNP Dynabeads® My One™ Streptavidin C1	25 µg hIgG	18,57 µg hIgG= 74,28 % hIgG	1,238*10 ⁻¹⁰ mol hIgG	7,46*10 ¹³ molekul hIgG

*MNP – modifikované magnetické částice

4.3 Dot-blot analýza

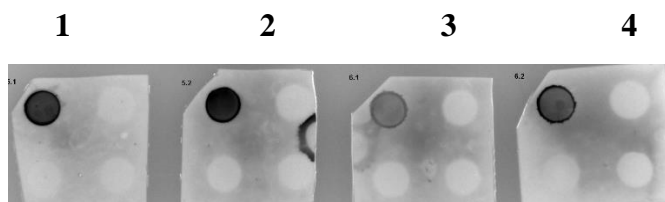
Dot-blot analýza se řadí mezi metody umožňující identifikaci proteinů. Na rozdíl od metody Western-blot chybí první separační krok, elektroforetické dělení proteinů neprobíhá a vzorek s antigeny je dávkován přímo na membránu. Výhodou je, že tato metoda není časově náročná a spotřeba vzorku i reagensů je malá. Dot-blot analýza byla provedena podle návodu popsaného v kapitole 3.12.

Tato metoda měla dokázat, že zkoumané protilátky proti kalretikulinu vykazují afinitu k příslušnému antigenu (kalretikulinu). Na membránu byly naneseny 3 µg antigenu na jamku, nespecifický antigen (BSA), poté byly napipetovány vhodně naředěné protilátky anti-CALR IgG a slepý vzorek (0,1 M fosfátový pufr pH 7,3). Slepý vzorek byl použit pro ověření případné nespecifické sorpce proteinů ze vzorku a také biokonjugátu. Dále byl na membránu nanesen konjugát (králičí anti-myší IgG protilátky proti kalretikulinu značené křenovou peroxidázou). Vzniklý imunokomplex byl vyhodnocen kolorimetricky pomocí komerčního kitu Opti-4CN™. Kompletní výsledek byl vyhodnocen na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Výsledný záznam Dot-blot analýzy je zobrazen na Obrázku 21 a 22.



Obrázek 21: Výsledek Dot-blot analýzy, testování vybraných protilátek anti-CALR IgG s rekombinantním proteinem CALR

1 – anti-CALR IgG klon 9B4 (monoklonální myší protilátka, purifikované), 2 – anti-CALR IgG klon 8B3 (monoklonální myší protilátka, purifikované), 3 – anti-CALR IgG klon 5C1 (monoklonální myší protilátka, purifikované), 4 – anti-CALR IgG klon 2G8 (monoklonální myší protilátka), 5 – anti-CALR IgG klon 4D4 (monoklonální myší protilátka purifikované).



Obrázek 22: Výsledek Dot-blot analýzy, testování vybraných protilátek anti-CALR IgG s rekombinantním proteinem CALR

1 – anti-CALR IgG klon 5.1 (monoklonální myší protilátka, nepurifikované), 2 – anti-CALR IgG klon 5.2 (monoklonální myší protilátka, nepurifikované), 3 – anti-CALR IgG klon 6.1 (monoklonální myší protilátka, nepurifikované), 4 – anti-CALR IgG klon 6.2 (monoklonální myší protilátka, nepurifikované).

Výsledky Dot-blot analýzy byly hodnoceny pouze vizuálně. Výsledky Dot-blot potvrzují reaktivitu antigenu s protilátkami anti-CALR IgG klon 4D4, 9B4 a monoklonální myší anti-CALR IgG klon 5.1 v kultivačním médiu. Dle výsledků Dot-blot analýzy byly pro další experimenty (imobilizace na dva druhy magnetických částic (magnetické částice modifikované proteinem A, magnetické částice s –COOH funkční skupinou)) vybrány monoklonální myší anti-CALR IgG purifikované klon 4D4 a 9B4 a nepurifikované monoklonální myší anti-CALR IgG klon 5.1.

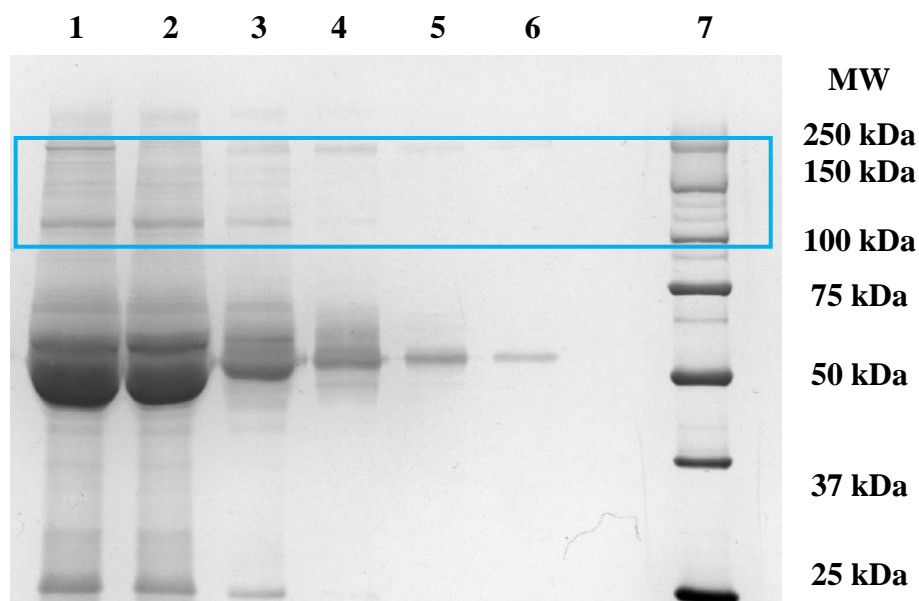
4.4 Příprava imunosorbentu pro záchyt biomarkeru zánětu kalretikulinu

Pro přípravu imunosorbentů pro záchyt kalretikulinu, biomarkeru zánětu, byly vybrány 2 nosiče, na které se modelové lidské IgG molekuly vázaly nejlépe (PURE PROTEOM™ PROTEIN A, Dynabeads® My One™ Carboxylic acid) Způsoby vazby anti-CALR IgG molekul se u obou nosičů lišily. Na magnetické částice modifikované Proteinem A se vázaly anti-CALR IgG molekuly nekovalentně díky mnohým nekovalentním interakcím, na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou probíhala vazba anti-CALR IgG molekul kovalentně, avšak nekontrolovatelně, co se týče orientace IgG molekuly k povrchu nosiče.

4.4.1 Vazba specifických anti-CALR IgG molekul na nosič s agarózou a s Proteinem A

Po předchozích neúspěšných pokusech navázat anti-CALR IgG molekuly na magnetické částice modifikované Proteinem A, byl pro tento experiment použit nosič s vázaným Proteinem A.

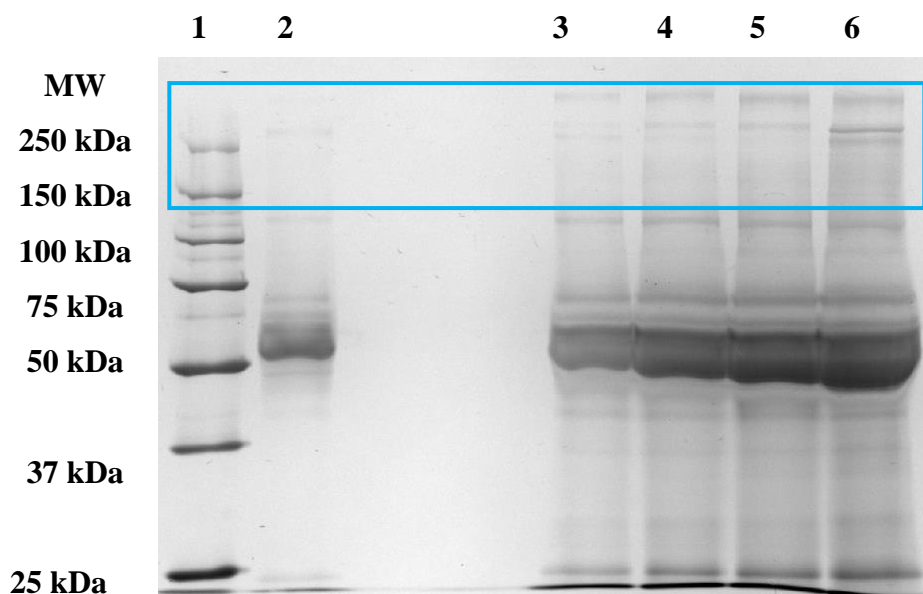
Vazba specifických anti-CALR IgG molekul na nosič byla provedena podle návodu, který byl popsán v kapitole 3.13. Pro vazbu anti-CALR IgG molekul byla použita plastová mikrokolona Bio-Spin (5 cm, objem 1,2 ml, Bio-Rad, USA) naplněná Affi-Gelem Protein A s kapacitou 8-10 mg IgG/nosič. Pevnou fázi tvořila kovalentně provázaná a stabilizovaná agaróza, na jejíž povrch byl Protein A kovalentně vázán. K vazbě byl použit 1 ml anti-CALR IgG molekul klon 4D4 a 9B4. Pomocí SDS-PAGE byla zkontrolována vazba IgG na nosič s Proteinem A. Na 10% gel byl napipetován původní vzorek anti-CALR IgG, vazebná frakce a první 4 promývací frakce (0,1 M fosfátových pufr pH 8,0 s 0,15 M NaCl). Gel byl obarven roztokem amoniakálního stříbra a vyhodnocen na stanici ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab™. Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy je zobrazen na Obrázku 23 a 24.



Obrázek 23: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby anti-CALR IgG molekul (klon 9B4) na nosič s Proteinem A

1 – původní vzorek anti-CALR IgG molekul klon 4D4 (0,5 μ g na jamku), 2 – vazebná frakce (0,1 M fosfátových pufr pH 8,0 s 0,15 M NaCl), 3–6 promývací frakce (0,1 M fosfátových pufr pH 8,0 s 0,15 M NaCl), 7 – standard molekulových hmotností; polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

V jamce č. 1 jsou viditelné proužky odpovídající původnímu vzorku anti-CALR IgG molekul klon 4D4. Do jamky č. 2 byla napipetovaná vazebná frakce roztoku anti-CALR IgG klon 4D4. Do jamek č. 3, 4, 5, 6 byly napipetovány aliquoty promývacích frakcí. V jamce č. 7 jsou viditelné proužky odpovídající směsi proteinů o známých molekulových hmotnostech. V tomto případě byla hodnocena vazba anti-CALR IgG molekul pouze vizuálně. Anti-CALR IgG molekuly se na nosič s Proteinem A zdánlivě navázaly, ale v promývacích krocích došlo k jejich opětovnému vymytí. Pravděpodobně se jednalo o slabé interakce v důsledku nespecifické sorpce.



Obrázek 24: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby anti-CALR IgG molekul (klon 9B4) na nosič s Proteinem A

1 – standard molekulových hmotností, 2 – promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 8,0 s 0,15 M NaCl), 3–4 promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 8,0 s 0,15 M NaCl), 5 – vazebná frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 8,0 s 0,15 M NaCl), 6 – původní vzorek anti-CALR IgG molekul klon 9B4 (0,5 µg na jamku); polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

Vazba anti-CALR IgG molekul klon 9B4 na nosič s Proteinem A probíhala za stejných podmínek jako předchozí vazba. V jamce č. 1 jsou viditelné proužky odpovídající směsi proteinů o známých molekulových hmotnostech. Do jamek č. 2, 3, 4 byly napipetovány aliquoty promývacích frakcí. Do jamky č. 5 byla napipetovaná vazebná frakce roztoku anti-CALR IgG klon 9B4. V jamce č. 6 jsou viditelné proužky odpovídající původnímu vzorku anti-CALR IgG molekul klon 9B4. V tomto případě byla hodnocena vazba anti-CALR IgG pouze vizuálně. Anti-CALR IgG molekuly se na nosič s Proteinem A navázaly, ale v promývacích krocích došlo k jejich vymytí. K pouhé nespecifické sorpci anti-CALR IgG molekul docházelo pravděpodobně proto, že použité protilátky anti-CALR IgG vyrobené hybridomovou technologií byly myšího původu a mají slabší afinitu k Proteinu A než protilátky lidské, alespoň co se týče podtřídy IgG₁. Tabulka 3 znázorňuje přehled vazeb protilátek k Proteinu A.

Tabulka 3: Přehled síly vazby protilátek k Proteinu A, převzato a upraveno [266]

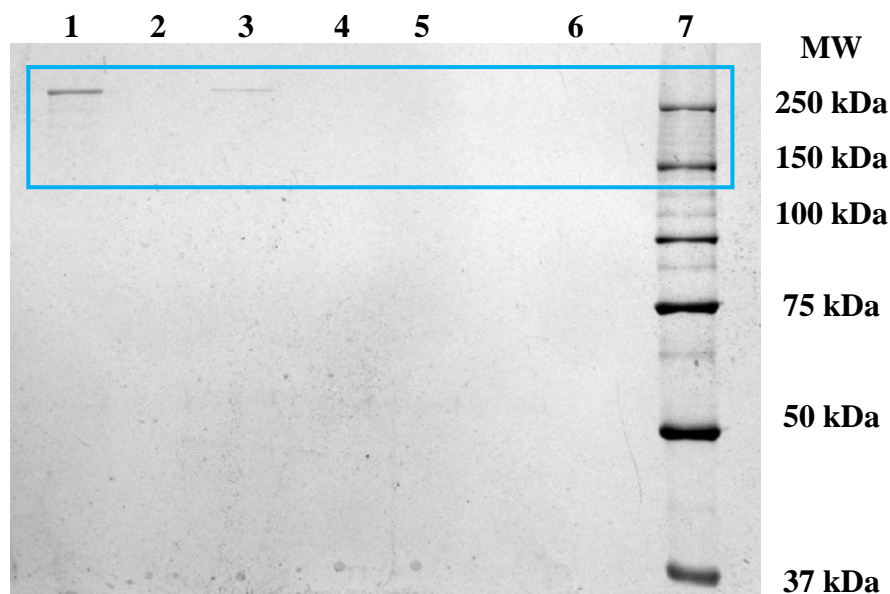
Druh protilátek	Podtřída	Síla vazby k proteinu A	Druh protilátek	Podtřída	Síla vazby k proteinu A
Lidské	IgG1	Silná vazba	Ovčí	IgG1	Neváže se
	IgG2	Silná vazba		IgG2	Silná vazba
	IgG3	Neváže se		IgM	Neváže se
	IgG4	Silná vazba	Kozí	IgG1	Slabá vazba
	IgA	Neváže se		IgG2	Slabá vazba
	IgM	Neváže se		IgM	Neváže se
Myší	IgG1	Slabá vazba	Hovězí	IgG1	Neváže se
	IgG2a	Silná vazba		IgG2	Silná vazba
	IgG2b	Silná vazba	Králičí	IgG	Silná vazba
	IgG3	Silná vazba		IgM	Neváže se
	IgM	Neváže se			
Kryší	IgG1	Slabá vazba			
	IgG2a	Neváže se			
	IgG2b	Neváže se			
	IgG2c	Silná vazba			
	IgM	Neváže se			

4.4.2 Vazba specifických anti-CALR IgG molekul na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou

Vazba specifických anti-CALR IgG molekul klon 5.1 na povrch magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou byla provedena podle návodu, který byl popsán v kapitole 3.14.

K vazbě byl použit 1 mg magnetických částic (Dynabeads® My One™ Carboxylic acid) a použito 20 µg specifických anti-CALR IgG molekul klon 5.1. Sulfo-NHS byl použit jako síťovadlo kvůli lepší stabilitě a účinnosti vazby. Pomocí SDS-PAGE byla zkontrolována vazba specifických anti-CALR IgG molekul klon 5.1 na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou. Na 10% gel byl napipetován původní vzorek specifických anti-CALR IgG molekul, vazebná frakce (0,1 M MES

pufr pH 5,0) a první 3 promývací frakce (PBS pufr pH 7,4). Gel byl obarven roztokem amoniakálního stříbra a vyhodnocen na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy je zobrazen na Obrázku 25.



Obrázek 25: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby anti-CALR IgG molekul (klon 5.1) na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou

1 – původní vzorek anti-CALR IgG molekul klon 5.1 standard molekulových hmotností, 2 – vazebná frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 3-6 – promývací frakce (0,1 M PBS pufr pH 7,4), 7 – vazebná frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 7 – standard molekulových hmotností; polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

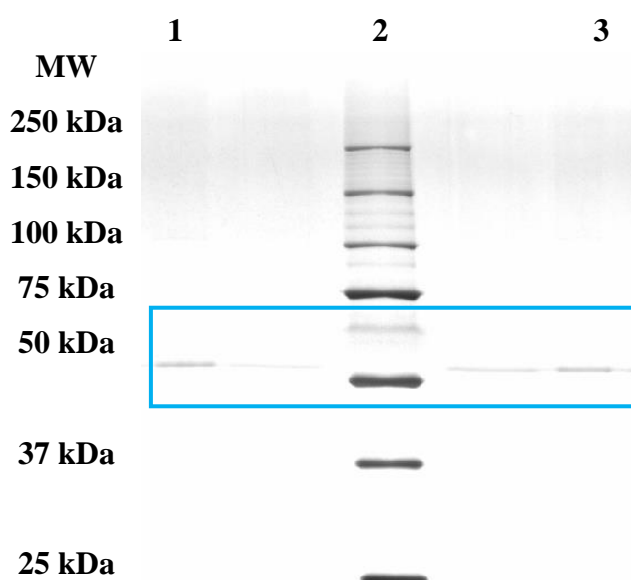
V jamce č. 1 se nachází výrazný proužek odpovídající vzorku anti-CALR IgG protilátek klon 5.1 Do jamky č. 2 byla napipetovaná vazebná frakce roztoku s koncentrací anti-CALR IgG protilátek 20 µg. Do jamek č. 3, 4, 5, 6 byly napipetovány aliquoty promývacích frakcí. V jamce č. 7 jsou viditelné proužky odpovídající směsi proteinů o známých molekulových hmotnostech. Dle intenzity zabarvení a šíře proužků byla pomocí ImageLab stanovena účinnost vazby a to 88 %.

Tento způsob vazby byl opakován minimálně 2x, vždy s přibližně stejným výsledkem. Dosažené hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 86 do 88 %, tedy průměrná účinnost vazby byla 87 %.

4.5 Ověření funkčnosti imunosorbentu

K ověření funkčnosti vytvořeného imunosorbentu byly vybrány magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou s navázanými monoklonálními myšími protilátkami (klon 5.1) se specifitou proti kalretikulínu.

Pro samotnou vazbu byly zvoleny 2 µg antigenu kalretikulínu (rekombinantní protein, lidský, produkovaný v *Escherichia coli*). Vazba antigenu probíhala podle návodu popsaného v kapitole 3.15. Pomocí SDS-PAGE analýzy byla zkontrolována vazba antigenu kalretikulínu na připravený imunosorbent. Na 12% gel (lepší záchyt antigenu kalretikulínu) byl napipetován vzorek po vazbě a eluční frakce (0,05% roztok TFA pH 2,3). Gel byl obarven roztokem amoniakálního stříbra a vyhodnocen na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy je zobrazen na Obrázku 26 a 27.



Obrázek 26: Výsledný záznam SDS-PAGE analýzy: kontrola vazby a eluce antigenu kalretikulínu na/z imunosorbent/u (PBS pufr pH 7,4)

1 – vazebná frakce antigenu kalretikulínu (PBS pufr pH 7,4), 2 – standard molekulových hmotností, 3 – eluční frakce (0,05% TFA roztok pH 2,3); polyakrylamidový 12% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

V jamce č. 1 se nachází výrazný proužek odpovídající vazebné frakci vzorku antigenu kalretikulínu (PBS pufr pH 7,4), v jamce č. 2 jsou vidět výrazné proužky odpovídající směsi proteinů o známých molekulových hmotnostech. V jamce č. 3 je napipetovaná eluční frakce (0,05% roztok TFA pH 2,3). V tomto případě byla

hodnocena vazba antigenu kalretikulinu na imunosorbent pouze vizuálně. Pro ověření funkčnosti imunosorbentu byl použit antigen rekombinantního proteinu kalretikulinu. Vazba kalretikulinu na imunosorbent a jeho následná eluce (0,05% roztok TFA pH 2,3) byla potvrzena.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit vhodný imunosorbent pro záchyt kalretikulinu, biomarkeru zánětu, ve vzorcích plodové vody. Kalretikulin je glykoprotein nacházející se v lumen endoplazmatického retikula. Význam kalretikulinu v plodové vodě zatím není zcela jasný, ale vědci se domnívají, že jeho zvyšující se koncentrace by mohla souviset s postupujícím intrauterinním zánětem. Proto byl vybrán jako jeden ze 3 biomarkerů způsobující PPRM v důsledku intrauterinního zánětu.

Připravený imunosorbent vznikl vazbou specifických anti-CALR IgG na povrchu magnetických částic se specifickou funkční skupinou. Vhodné magnetické částice pro přípravu imunosorbentu pro záchyt kalretikulinu byly vybrány na základě vazeb modelových IgG molekul se čtyřmi různými typy nosičů. V závislosti na účinnosti vazby IgG molekul na povrch magnetických částic, byly vybrány 2 nosiče jejichž účinnost vazby byla nejvyšší.

Nosič na bázi magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou byl úspěšně použit pro vazbu anti-CALR IgG molekul. Specifita a funkčnost imunosorbentu byla následně ověřena pomocí lidského kalretikulinu, jeho rekombinantní formy. Vazba a následná eluce byla experimentálně potvrzena. Nosič může být použit jako součást senzoru pro simultánní stanovení třech biomarkerů v plodové vodě.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] UNDERWOOD M., GILBERT W. & SHERMAN M. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *Journal of Perinatology*. 2005, vol. 25, s. 341-348. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/7211290>.
- [2] MĚCHUROVÁ A., Předčasný odtok vody plodové. *Moderní babičtví*. 2004, vol. 3., s. 33-36. Dostupné z: <https://www.levret.cz/publikace/casopisy/mb/2004-3/?pdf=143>.
- [3] ZOPPI L. What is Amniotic Fluid? *News-Medical*. 2018. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Amniotic-Fluid.aspx>.
- [4] BONSNES R. W. Composition of amniotic fluid. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1966, vol. 9(2), s. 440-448. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5330415/>.
- [5] BRACE R. A., WOLF E. J. Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1989, vol. 161, s. 382-388. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2764058/>.
- [6] CHEING C. Y. Vascular endothelial growth factor activation of intramembranous absorption: a critical pathway for amniotic fluid volume regulation. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2004, vol. 11, s. 63-74. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14980307/>.
- [7] WANG S., KALLICHANDA N., et al. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2001, vol. 185, s. 1226-1231. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11717661/>.
- [8] DE SANTIS M., CAVALIERE A. F., et al. Acute recurrent polyhydramnios and amniotic prolactin. *Prenatal Diagnosis*. 2000, vol. 20, s. 347-8. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10740211/>.
- [9] BEALL M.H., VAN DEN WIJNGAARD J. P., et al. Amniotic fluid water dynamics. *Placenta*. 2007, vol. 28(8-9), s. 816-23. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17254633/>.
- [10] MOORE T. R. The role of amniotic fluid assessment in evaluating fetal well-being. *Clinics in Perinatology*. 2011, vol. 38, s. 33-46. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21353088/>.
- [11] TEN BROEK C. M., BOTS J., et al. Amniotic fluid deficiency and congenital abnormalities both influence fluctuating asymmetry in developing limbs of human deceased fetuses. *PLoS One*. 2013, vol. 8(11), s. 81824. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3842303/>.
- [12] AKINBI H. T., NARENDRAN V., et al. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004, vol. 191, s. 2090-2096. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15592296/>.
- [13] ČECH E., HÁJEK Z., MARŠÁL K. a kol. Vznik a vývoj těhotenství. *Porodnictví*. Praha: Grada Publishing. 2014. ISBN 80 7169 355 3, s. 27-51.
- [14] MICHAEL J. E., et. al. Comprehensive Proteomic Analysis of the Human Amniotic Fluid Proteome: Gestational Age-Dependent Changes. *Journal of Proteome Research*. 2007, vol. 1277-1285, s. 94. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17373841/>.
- [15] KWON H., WU G., BAZER F. W., et al. Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biology of Reproduction*. 2003, vol. 69(5), s. 1626-1634. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12855596/>.
- [16] B. W., READ L. C., PLOPPER C. G., et al. Prenatal exposure to epidermal growth factor attenuates respiratory distress syndrome in rhesus infants. *Pediatric Research*. [online]. 1994, vol. 35, s. 30-36. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/pr19948>.

- [17] DVORAK B., FITUCH C. C., et al. Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatric Research*. [online]. 2003, vol., 54, s. 15-19. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8134196/>.
- [18] JUUL S. E., CHRISTENSEN R. D. Absorption of enteral recombinant human erythropoietin by neonates. *Annals of Pharmacotherapy*. 2003, vol. 37, s. 782-786. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12773061/>.
- [19] YAMADA T., MATSUBARA S., et. al. Chemotactic activity for polymorphonuclear leukocytes: meconium versus meconium-stained amniotic fluid. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2000, vol. 44, s. 275-278. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10708241/>.
- [20] HSUEH W., CAPLAN M. S., et al. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatric and Developmental Pathology*. 2003, vol. 6(1), s. 6-23. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12424605/>.
- [21] BAN X., BILLIAH M. M., et al. Metabolism of platelet activating factor in human fetal membranes and decidua vera. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1986, vol. 246, s. 9-18. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003986186904443>.
- [22] ČUTKA K., ČUTKA D., et al. Amniocentéza – bezpečná metoda invazivní prenatální diagnostiky. *Praktická gynekologie*. 2007, vol. 11(1), s. 23-25. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/prakticka-gynekologie/2007-1/amniocenteza-bezpecna-metoda-invazivni-prenatalni-diagnostiky-48630>.
- [23] JINDAL A., SHARMA M., CHAUDHARY C. Amniocentesis. In: StatPearls. *Treasure Island* (FL). 2022. ISBN 978-613-2-89920-0.
- [24] GREGOR V., ŠÍPEK A. Efektivita prenatální diagnostiky v České republice v období 1994-2008. *Aktuální gynekologie a porodnictví*. 2009, vol. 1, s. 25-29. Dostupné z: https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2009_8.pdf.
- [25] American College of Obstetricians and Gynecologists No. 88. ACOG Practice Bulletin. Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstetrics & Gynecology*. 2007, vol. 110 (6), s. 1459-1467. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18055749/>.
- [26] TABOR A., ALFIREVIC Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 2010, vol. 27(1), s. 1-7. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20051662/>.
- [27] GHI T., SOTIRIADIS A., et al. International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG). ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis. *Ultrasound and Obstetrics & Gynecology*. 2016, vol. 48(2), s. 256-68. Dostupné z: <https://www.isuog.org/static/uploaded/94610a2c-0f11-47ce-bc1b2f789f216261.pdf>.
- [28] EUROAGENTEST. Amniocentéza. 2008. Dostupné z: <http://www.eurogentest.org/fileadmin/templates/eugt/leaflets/pdf/czech/amniocentesis.pdf>.
- [29] Practice Bulletin No. 162. Prenatal Diagnostic Testing for Genetic Disorders. *Obstetrics & Gynecology*. 2016, vol. 127(5), s. 976-978. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26938573/>.
- [30] CHAKSUWAT P., WANAPIRAK C., et al. A comparison of pregnancy outcomes after second-trimester amniocentesis between cases with penetration of the placenta and no penetration. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2020, vol. 16, s. 1-6. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32299277/>.
- [31] MACEK M., STUHRMANN M., et al. The direct early diagnosis of cystic fibrosis by the detection of the delta F508 CFTR gene mutation in a prematurely delivered boy. *Clinical Genetics*. 1991, vol. 39(3), s. 219-222. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1709842/>.

- [32] ANSALDI E., VOGLINO G., et al. Amniotic fluid testosterone and fetal sex determination (discussion of the endocrine function of the fetal testis). *Ric Clin Lab*. 1981, vol. 11(4), s. 349-354. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7323613/>.
- [33] CALDA P., et al. Ultrazvuková diagnostika v těhotenství: pro praxi. 1. vydání. Praha: Aprofema, 2007. ISBN 978-80-903706-1-6., s. 268.
- [34] SHERER D. M., LAGER O. Oligohydramnios: use and misuse in clinical management. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001, vol. 18(5), s. 411-419. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11844157/>.
- [35] BUNDGAARD A., ANDERSEN B. R., et al. Prevalence of polyhydramnios at a Danish hospital: A population-based study. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2007, vol. 86(12), s. 1427-1431. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00016340701447569>.
- [36] HEDERLINGOVÁ J., REDECHA M., ZÁHUMENSKÝ J. The finding of isolated oligohydramnios after 37th week of gestation and its association with perinatal outcome. *Česká gynekologie*. 2017, vol. 82(5), s. 351-354. Dostupné z: <https://www.cs-gynekologie.cz/en/journals/czech-gynaecology/2017-5-3/the-finding-of-isolated-oligohydramnios-after-37th-week-of-gestation-and-its-association-with-perinatal-outcome-61952?hl=cs>.
- [37] ASHWAL E., HIRSCH L., MELAMED N., et al. The association between isolated oligohydramnios at term and pregnancy outcome. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2014, vol- 290(5), s. 875-881. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24925346/>.
- [38] BRANTBERG A., BLAAS H. G., HAUGEN S. E., et al. Esophageal obstruction prenatal detection rate and outcome. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2007, vol. 30(2), s. 180-187. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17625804/>.
- [39] LIU L. L., PANG L. H., DENG B. Y., Prenatal Diagnosis and Pregnancy Outcome Analysis of Polyhydramnios. *Fetal and Pediatric Pathology*. 2016, vol. 35(1), s. 21-28. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26720631/>.
- [40] EASTABROOK G., AKSOY T. et al. Preeclampsia biomarkers: An assessment of maternal cardiometabolic health. *Pregnancy Hypertension*. 2018, vol. 13., s. 204-213. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30177053/>.
- [41] MIKOVÁ E., HRDÝ J. Role neutrofilů u preeklampsie. *Česká gynekologie*. 2020, vol. 85(3), s. 206-213. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2020-3-28/role-neutrofilu-u-preeklampsie-125800>.
- [42] KOZEROVSKÝ M. Preeklampsie – zkušenosti s vyšetřováním sFLT-1 a PIGF na GPK FN Plzeň. *Labor Aktuell*. 2020, vol. 1 s. 10-12. Dostupné z: <https://heyzine.com/flip-book/cbe4d882e1.html>.
- [43] PHIPPS E. A., THADHANI R., BENZING T., KARUMANCHI S. A. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nature Reviews Nephrology*. 2019, vol. 15(5), s. 275-289. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6472952/>.
- [44] BELL M. J. A historical overview of preeclampsia-eclampsia. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*. 2010, vol. 39(5), s. 510-518. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2951301/>.
- [45] KARUMANCHI S. A. Angiogenic factors in preeclampsia: from diagnosis to therapy. *Hypertension*. 2016, vol. 67(6), s. 1072-1079. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27067718/>.
- [46] HUTCHEON J. A., LISONKOVA S., JOSEPH K. S. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2011. vol. 25(4), s. 391-403. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21333604/>.
- [47] BARTSCH E., MEDCALF K. E., et al. High Risk of Pre-eclampsia Identification Group. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic

- review and meta-analysis of large cohort studies. *British Medical Journal*. 2016, vol. 353., s. 1753. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27094586/>.
- [48] HECHT J. L., ZSENGELLER Z. K., SPIEL M., KARUMANCHI S. A., ROSEN S. Revisiting decidual vasculopathy. *Placenta*. 2016, vol. 42, s. 37-43. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27238712/>.
- [49] HOD T., CERDEIRA A. S., KARUMANCHI S. A. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Cold Spring Harb. Perspect.* 2015. vol. 5., s. 23473. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26292986/>.
- [50] ROMERO R., CHAIWORAPONGSA T. Preeclampsia: a link between trophoblast dysregulation and an antiangiogenic state. *Journal of Clinical Investigation*. 2013, vol. 123, s. 2775-2777. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23934119/>.
- [51] GU V. Y., WONG M. H., et al. Calreticulin in human pregnancy and pre-eclampsia. *Molecular Human Reproduction*. 2008, vol. 14(5), s. 309-315. Dostupné z: <https://academic.oup.com/molehr/article/14/5/309/987351>.
- [52] POLETTINI J., SILVA M. G., et al. Expression profiles of fetal membrane nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases (NOX) 2 and 3 differentiates spontaneous preterm birth and pPROM pathophysiologies. *Placenta*. 2014, vol. 35(3), s. 188-194. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24439294/>.
- [53] ROBILLARD P. Y., DEKKER G., et al. An essay of reflection: why does preeclampsia exist in humans, and why are there such huge geographical differences in epidemiology? *Journal of Reproductive Immunology*. 2016, vol. 114, s. 44-47. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26253618/>.
- [54] SASAKI Y., et al. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clinical & Experimental Immunology*. 2007, vol. 149, s. 139-145. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17459078/>.
- [55] VAUGHT A. J., et al. Germline mutations in the alternative pathway of complement predispose to HELLP syndrome. *JCI Insight*. 2018, vol. 3, s. 99128. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29563339/>.
- [56] GELBER S. E., BRENT E., REDECHA P., et al. Prevention of defective placentation and pregnancy loss by blocking innate immune pathways in a syngeneic model of placental insufficiency. *Journal of Immunology*. 2015, vol. 195(3), s. 1129-1138. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26071558/>.
- [57] CAVALLI R. C., et al. Induced human decidual NK-like cells improve utero-placental perfusion in mice. *Plos One*. 2016, vol. 11, s. 0164353. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27736914/>.
- [58] RAMMA W., BUHIMSCHI I. A., et al. The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia. *Angiogenesis*. 2012, vol. 15(3), s. 333-340. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3409369/>.
- [59] GANDLEY R. E., ROHLAND J., ZHOU Y., et al. Increased myeloperoxidase in the placenta and circulation of women with preeclampsia. *Hypertension*. 2008, vol. 52(2), s. 387-393. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/hypertensionaha.107.107532>.
- [60] KIM S. M., PARK J. S., NORWITZ E. R., et al. Circulating levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) correlate with the presence and severity of preeclampsia. *Reproductive Sciences*. 2013, vol. 20(9), s. 1083-1089. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745712/>.
- [61] SCHIETTECATTE J., et al. Multicenter evaluation of the first automated Elecsys sFlt-1 and PlGF assays in normal pregnancies and preeclampsia. *Clinical Biochemistry*. 2010, vol. 43(9), s. 768-770. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20206155/>.

- [62] GELFAND S. L., FANAROFF J. M., WALSH M. C. Meconium stained fluid: approach to the mother and baby. *Pediatric Clinics of North America*. 2004, vol. 51(3), s. 655-667. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15157590/>.
- [63] RAHMAN S., UNSWORTH J., VAUSE S. Meconium in Labour. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*. 2013, vol. 23, s. 247-252. Dostupné z: [https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgict55.\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2907572](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgict55.))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2907572).
- [64] GANDHI C. K. Management of Meconium-Stained Newborns in the Delivery Room. *Neonatal Network*. 2018, vol. 37, s. 141-148. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29789053/>.
- [65] SWARNAM K., SORAISHAM A. S., SIVANANDAN S. Advances in the Management of Meconium Aspiration Syndrome. *International Journal of Pediatrics*. 2011, vol. 2012, s. 1-7. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22164183/>.
- [66] VAIN N. E., BATTON D. G. Meconium “aspiration” (or respiratory distress associated with meconium-stained amniotic fluid?) *Seminar in Fetal & Neonatal Medicine*. 2017, vol. 22(2), s. 214-219. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28411000/>.
- [67] ROMERO R., YOON B. H., et al. Bacteria and endotoxin in meconium-stained amniotic fluid at term: could intra-amniotic infection cause meconium passage? *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2014, vol. 27, s. 775-788. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24028637/>.
- [68] LEE J., ROMERO R., et al. Meconium aspiration syndrome: A role for fetal systemic inflammation. *American Journal of Obstetrics Gynecology*. 2016, vol. 214, s. 366. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26484777/>.
- [69] WISWELL T. E. Meconium aspiration syndrome; in Donn SM, Sinha SK (eds): *Manual of Neonatal Respiratory Care*. 2012, vol. 1, s. 555-564. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/272836326_Meconium_Aspiration_Syndrome_Possible_Pathophysiological_Mechanisms_and_Future_Potential_Therapies.
- [70] VAIN N. E., SZYLD E. G., et al. Oropharyngeal and nasopharyngeal suctioning of meconium-stained neonates before delivery of their shoulders: multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2004, vol. 364, s. 597-602. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15313360/>.
- [71] YAMADA T., MINAKAMI H., et al. Meconium-stained amniotic fluid exhibits chemotactic activity for polymorphonuclear leukocytes in vitro. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2000, vol. 46, s. 21-30. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10708241/>.
- [72] DE BEAUFORT A. J., BAKKER A. C. et al. Meconium is a source of pro-inflammatory substances and can induce cytokine production in cultured A549 epithelial cells. *Pediatric Research*. 2003, vol. 54, s. 491-495. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/pr2003458>.
- [73] SALVESEN B., NIELSEN E. W., et al. Mechanisms of complement activation and effects of C1-inhibitor on the meconium-induced inflammatory reaction in human cord blood. *Molecular Immunology*. 2009, vol. 46, s. 688-694. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18950866/>.
- [74] OKAZAKI K., KONDO M., et al. Serum cytokine and chemokine profiles in neonates with meconium aspiration syndrome. *Pediatric Research*. 2008, vol. 121, s. 748-753. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18346989/>.
- [75] RICKLIN D., HEJISHENGALLIS G., et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*. 2010, vol. 11, s. 785-797. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20720586/>.
- [76] CASTALLHEIM A., PHARO A., et al. Complement C5a is a key mediator of meconium-induced neutrophil activation. *Pediatric Research*. 2005, vol. 57(2), s. 242-247. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15585680/>.

- [77] BARRATT-DUE A., PISCHKE S. E., et al. Bride and groom in systemic inflammation—the bells ring for complement and Toll in cooperation. *Immunology*. 2012, vol. 217(11), s. 1047-1056. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22964230/>.
- [78] BERGAMINI C. M., GAMBETTI S., et al. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current Pharmaceutical Desing*. 2004, vol. 10(14), s. 1611-1626. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15134560/>.
- [79] SHIGU M., NONAKA S., et al. Activation of complement in normal serum by hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-related oxygen radicals produced by activated neutrophils. *Clinical & Experimental Immunology*. 1992, vol. 90(1), s. 72-78. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1327592/>.
- [80] WILMOTT R. W., BUSH A., et al. Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children. *The Netherlands*. 2019, vol. 9, s. 9. Dostupné z: <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/kendigs-disorders-of-the-respiratory-tract-in-children-ninth-edit>.
- [81] SINGH B. S., CLARK R. H., et al. Meconium aspiration syndrome remains a significant problem in the NICU: Outcomes and treatment patterns in term neonates admitted for intensive care during a ten-year period. *Journal of Perinatology*. 2009, vol. 29(7), s. 497-503. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19158800/>.
- [82] TSIMIS M. E., ABI AL-HAMAYEL N., et al. Prematurity: present and future. *Minerva Gynecology*. 2015, vol. 67(1), s. 35-46. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25300768/>.
- [83] DOYLE L. W. Outcome at 5 years of age of children 23 to 27 weeks' gestation: refining the prognosis. *Pediatrics*. 2001, vol. 108(1), s. 134-141. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11433066/>.
- [84] GOLDEBERG R. L., CULHANE J. F. et al. Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet*. 2008, vol. 371, s. 75-84. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18177778/>.
- [85] O'CONNOR A. R., WILSON C. M. Ophthalmological problems associated with preterm birth. *Eye*. 2007, vol. 21(10), s. 1254-1260. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17914427/>.
- [86] MELVILLE J., MOSS T. The immune consequences of preterm birth. *Frontiers in Neuroscience*. 2013, vol. 7, s. 79. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23734091/>.
- [87] JAMES-TODD T., WISE L., et al. Preterm birth and subsequent risk of type 2 diabetes in black women. *Epidemiology*. 2014, vol. 25(6), s. 805-810. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25166879/>.
- [88] MEIS P. J., ERNEST J. M. et al. Causes of low birth weight births in public and private patients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1987. vol. 156(5), s. 1165-1168. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3578431/>.
- [89] KACEROVSKÝ M., KOKRDOVÁ Z., et al. Spontánní předčasný porod – Doporučený postup. *Česká gynekologie*. 2017, vol. 82(2), s. 160-165. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2017-2-13/spontanni-predcasny-porod-doporuceny-postup-61068>.
- [90] ROMERO R., VELEZ E., et al. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2010, vol. 202(5), s. 431. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20452482/>.
- [91] GIMEZ L. G., KRUPITZKI H. B., et al. Maternal and neonatal epidemiological features in clinical subtypes of preterm birth. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2016, vol. 29(19), s. 3153-3161. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26701680/>.

- [92] BRANUM A. M., SCHOENDORF K. C. The influence of maternal age on very preterm birth of twins: differential effects by parity. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*. 2005, vol. 19(5), s. 399-404. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16115292/>.
- [93] MERCER B. M., GOLDENBERG R. L. et al. The Preterm Prediction Study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 1999, vol. 181(5), s. 1216-1221. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10561648/>.
- [94] MUGLIA L. J., KATZ M. The enigma of spontaneous preterm birth. *New England Journal of Medicine*. 2010, vol. 362(6), s. 529-535. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20147718/>.
- [95] GOLDENBERG R. L., GOEPFERT A. R. Biochemical markers for the prediction of preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005, vol. 192(5), s. 36-46. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15891711/>.
- [96] TU F. F., GOLDBERG R. L. Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) levels as predictors of spontaneous preterm birth. *Obstetrics and Gynecology*. 1998, vol. 92, s. 446-449. Dostupné z: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(08\)60074-4/fulltext?version=printerFriendly&code=lancet-site](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(08)60074-4/fulltext?version=printerFriendly&code=lancet-site).
- [97] RONNA L. CH. Biochemical markers of spontaneous preterm birth in asymptomatic women. *Department of Epidemiology*. 2014, vol. 2, s. 164081. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/260255456_Biochemical_Markers_of_Spontaneous_Preterm_Birth_in_Asymptomatic_Women.
- [98] PARK C. W., LEE S. M., et al. The antenatal identification of funisitis with a rapid MMP-8 bedside test. *Journal of Perinatology Medicine*. 2007, vol. 36(6), s. 497-502. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19127606/>.
- [99] ROMERO R., GOTSCH F., et al. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutrition Reviews*. 2007, vol. 65(2), s. 194-202. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18240548/>.
- [100] GOLDENBERG R. L., CULHANE J. F. Infection as a cause of preterm birth. *Clinical Perinatology*. 2003, vol. 30(4), s. 677-700. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14714919/>.
- [101] LAHRA M. M., JEFFERY H. E. A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004, vol. 190(1), s. 147-151. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14749651/>.
- [102] YKES L., McINTYRE D. A., et al. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour. *Mediators Inflammation*. 2012, vol. 1, s. 967629. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22719180/>.
- [103] PITIPHAT W., GILLMAN M. W. et al. Plasma C-reactive protein in early pregnancy and preterm delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005, vol. 162(11), s. 1108-1113. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16236995/>.
- [104] LAAR R., HAM D. P., et al. Accuracy of C-reactive protein determination in predicting chorioamnionitis and neonatal infection in pregnant women with premature rupture of membranes: a systematic review. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 2009, vol. 147(2), s. 124-129. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19819609/>.
- [105] GHEZZI F., FRANCHI M., et al. Elevated amniotic fluid C-reactive protein at the time of genetic amniocentesis is a marker for preterm delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002, vol. 186(2), s. 268-273. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11854648/>.
- [106] KACEROVSKÝ M., MUSILOVÁ I. Management of preterm prelabor rupture of membranes with respect to the inflammatory complications – our experiences. *Česká*

- gynekologie*. 2013, vol. 78(6), s. 509-513. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2013-6/management-predcasneho-odtoku-plodove-vody-s-ohledem-na-zanetlive-komplikace-nase-zkusenosti-46993>
- [107] KOUCKÝ M., GERMANOVÁ A., et al. Novinky v patofyziologii a managementu předčasného porodu. *Česká gynekologie*. 2009, vol. 74(1), s. 54-63. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2009-1/novinky-v-patofyziologii-a-managementu-predcasneho-porodu-2621>.
- [108] HOLST R. M., LAURINI R., et al. Expression of cytokines and chemokines in cervical and amniotic fluid: relationship to histological chorioamnionitis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2007, vol. 20(12), s. 885-893. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14767050701752601>.
- [109] POLLARD J. K., MICHELL M. D. Effects of gestational age on prostaglandin production and its regulation in human myometrial cells. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 1996, vol. 5(2), s. 93-98. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8796776/>.
- [110] ROMERO R., YOON B. H., et al. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6, and gram stain in the detection of microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1993, vol. 169(4), s. 839-851. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7694463/>.
- [111] ROMERO R., EMAMIAN M., et al. The value and limitations of the Gram stain examination in the diagnosis of intraamniotic infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1988, vol. 159(1), s. 114-119. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2456013/>.
- [112] CHAEMSAITHONG P., ROMERO R., et al. A point of care test for interleukin-6 in amniotic fluid in preterm prelabor rupture of membranes: a step toward the early treatment of acute intra-amniotic inflammation/infection. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2016, vol. 29(3), s. 360-367. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25758620/>.
- [113] KACEROVSKÝ M. Předčasný odtok plodové vody před termínem porodu. *Labor Aktuell*. 2018, vol. 3, s. 18-23. Dostupné z: <https://heyzine.com/flip-book/95afac25c8.html#page/2>.
- [114] LEE S. E., ROMERO R., et al. The frequency and significance of intraamniotic inflammation in patients with cervical insufficiency. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008, vol. 198, s. 633. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18342290/>.
- [115] ASRAT T. Intra-amniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes. Pathophysiology, detection, and management. *Clinical Perinatology*. 2001, vol. 28(4), s. 736-739. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11817186/>.
- [116] CAROLL S. G., PAPAIOANNOU S., et al. Lower genital tract swabs in the prediction of intrauterine infection in preterm prelabour rupture of the membranes. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1996, vol. 103(1), s. 54-59. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8608099/>.
- [117] GOLDENBERG R. L., ANDREWS W. W., et al. The Alabama preterm birth study: umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborns. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2008, vol. 198(1), s. 43. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18166302/>.
- [118] LIM E. S., WANG D., et al. The bacterial microbiome and virome milestones of infant development. *Trends in Microbiology*. 2016, vol. 24(10), s. 801-810. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27353648/>.
- [119] ANDREWS W.W., GOLDENBERG R. L., et al. Endometrial microbial colonization and plasma cell endometritis after spontaneous or indicated preterm versus term delivery.

- American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005, vol. 193(3), s. 739-745. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16150268/>.
- [120] HILLIER M. A., KROHN L. K., et al. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clinical Infectious Diseases*. 1993, vol. 16(4), s. 273-281. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8324131/>.
- [121] NUGENT R. P., KROHN M. A., et al. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991, vol. 29(2), s. 297-301. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1706728/>.
- [122] MCGREGOR J. A., FRENCH J. I. Bacterial vaginosis and preterm birth. *The New England Journal of Medicine*. 1996, vol. 334(20), s. 1338-1339. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8609962/>.
- [123] KACEROVSKÝ M., MUSILOVÁ I. Management předčasného odtoku plodové vody s ohledem na zánětlivé komplikace – naše zkušenosti. *Česká gynekologie*. 2013, vol. 78(6), s. 509-513. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2013-6/management-predcasneho-odtoku-plodove-vody-s-ohledem-na-zanetlive-komplikace-nase-zkusenosti-46993>.
- [124] KACEROVSKÝ M., PLÍŠKOVÁ L., et al. The microbial load with genital mycoplasmas correlates with the degree of histologic chorioamnionitis in preterm PROM. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011, vol. 205(3), s. 213. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21663889/>.
- [125] DiGIULIO D. B., ROMERO R., et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008, vol. 3(8), s. 3056. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18725970/>.
- [126] COTCH M. F., PASTOREK J. G. Nugent RP. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sexually Transmitted Diseases*. 1997, vol. 24(6), s. 353-360. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9243743/>.
- [127] STEEL J. H., MALATOS S., et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatric Research*. 2005, vol. 57(3), s. 404-411. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15659699/>.
- [128] COLLADO M. C., RAUTAVA S., et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*. 2016, vol. 6, s. 23129. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27001291/>.
- [129] LIM E. S., et al. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome*. 2018, vol. 6(1), s. 87. Dostupné z: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0475-7>.
- [130] HORN P. Poliomyelitis in pregnancy. A twenty-year report from Los Angeles County, California. *Obstetrics & Gynecology*. 1955, vol. 6, s. 121-137. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13244968/>.
- [131] WENSTROM K. D., ANDREWS W. W., et al. Intrauterine viral infection at the time of second trimester genetic amniocentesis. *Obstetrics & Gynecology*. 1998, vol. 92(3), s. 420-424. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9721782/>.
- [132] ROWLAND S., DANIELEWSKI J. A., et al. Microbial invasion of the amniotic cavity in midtrimester pregnancies using molecular microbiology. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2017, vol. 217(1), s. 71. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28268197/>.
- [133] KACEROVSKY M., TOSNER J., et al. Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in preterm premature rupture of membranes. *Česká gynekologie*. 2009, vol. 74(2), s. 85-91. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19514653/>.

- [134] MERCER B. M. Preterm premature rupture of the membranes: current approaches to evaluation and management. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2005, vol. 32(3), s. 411-428. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16125041/>.
- [135] MENON R., FORTUNATO S. J. Infection and the role of inflammation in preterm premature rupture of the membranes. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2007, vol. 21(3), s. 467-478. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17448730/>.
- [136] MERCER B. M., GOLDENBERG R. L., et al. The Preterm Prediction Study: prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2000, vol. 183(3), s. 738-745. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10992202/>.
- [137] MUSILOVÁ I., KUTOVÁ R., et al. Intraamniotic Inflammation in Women with Preterm Prelabor Rupture of Membranes. *PLOS One*. 2015, vol. 10(7), s. 7. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4514652/>.
- [138] YOON B. H., ROMERO R., et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2001, vol. 185, s. 1130-1138. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11717646/>.
- [139] FLENADY V., KING J. Antibiotics for prelabour rupture of membranes at or near term. *Cochrane Library*. 2002, vol. 3, s. 1807. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12137635/>.
- [140] KENYON S. L., TAYLOR D. J., et al. ORACLE Collaborative Group. Broad-spectrum antibiotics for spontaneous preterm labour: the ORACLE II randomised trial. ORACLE Collaborative Group. *Lancet*. 2001, vol. 357, s. 989-994. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11293641/>.
- [141] VAN DER HAM D. P., VIJGEN S. M., et al. Induction of labor versus expectant management in women with preterm prelabor rupture of membranes between 34 and 37 weeks: a randomized controlled trial. *PLOS ONE*. 2012, vol. 9, s. 1208. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22545024/>.
- [142] VAN DER HAM D. P., VAN DER HEYDEN J. L., et al. Management of late-preterm premature rupture of membranes: the PPROMEXIL-2 trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2012, vol. 207, s. 276. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22901981/>.
- [143] PORRECO R. P., HEYBORNE K. D., et al. Amniocentesis in the management of preterm premature rupture of the membranes: a retrospective cohort analysis. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2008, vol. 21(8), s. 573-579. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18609359/>.
- [144] GORODESKI I. G., HAIMOVITZ L., et al. Reevaluation of the pH, ferning and Nile blue sulphate staining methods in pregnant women with premature rupture of the fetal membranes. *The Journal of Perinatal Medicine*. 1982, vol. 10(6), s. 286-292. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7161689/>.
- [145] PARRY S., et al. Premature Rupture of the Fetal Membranes. *The New England Journal of Medicine*. 2014, vol. 338(10), s. 663-670. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9486996/>.
- [146] ABDELAZIM I. A., et al. Fetal fibronectin (Quick Check fFN test) for detection of premature rupture of fetal membranes. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2013, vol. 287(2), s. 205-210. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22968578/>.
- [147] KACEROVSKÝ M., TAMBOR V., et al. Proteomika a karcinom ovaria. *Česká gynekologie*. 2009, vol. 74(3), s. 163-170. Dostupné z:

<https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2009-3/proteomika-a-biomarkery-karcinomu-ovaria-5854>.

[148] BOHUNICKY B., MOUSA S. A. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnol. Sci. Appl. National Cancer Institute*. 2011, vol. 4, s. 1-10. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3781701/>.

[149] BAKER S. G. The central role of receiver operating characteristic (ROC) curves in evaluating tests for the early detection of cancer. *The Journal of the National Cancer Institute*. 2003, vol. 95(7), s. 511-515. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jnci/article/95/7/511/2520685>.

[150] KORECKÁ L., VYTRAS K., et al. Immunosensors in Early Cancer Diagnostics: From Individual to Multiple Biomarker Assays. *Current Medicinal Chemistry*. 2018, vol. 25(33), s. 3973-3987. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29165064/>.

[151] PEPE M. S., ETZIONI R., et al. Phases of biomarker development for early detection. *The Journal of the National Cancer Institute*. 2001, vol. 93(14), s. 1054-1061. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11459866/>.

[152] HAJIAN-TILAKI K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2013, vol. 4(2), s. 627-635. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755824/>

[153] ČADKOVÁ M., METELKA R., et al. Magnetic beadsbased electrochemical immunosensor for monitoring allergenic food proteins. *Analytical Biochemistry*. 2015, vol. 484, s. 4-8. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25963896/>.

[154] GANDHI N. A., BENNET B. L., et al. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016, vol. 15(1), s. 35-50. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26471366/>.

[155] GOLDEBERG R. L., GOEPFERT A. R., et al. Biochemical markers for the prediction of preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005, vol. 192(5), s. 36-46. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15891711/>.

[156] ROSE-JOHN S., SCHELLER J., et al. "Family reunion"—A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2015, vol. 26(5), s. 471-474. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26235233/>.

[157] TANAKA T., NARAZAKI M., et al. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Seminars in Immunology*. 2014, vol. 26(1), s. 88-96. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24594001/>.

[158] TANAKA T., NARAZAKI M., et al. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*. 2018, vol. 10(8), s. 28456. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28778870/>.

[159] SIEGMETH A., GARBUZ D. S., et al. Do You Make a Diagnosis of an Infected Arthroplasty? *Evidence-Based Orthopaedicsy*. 2009, vol. 91, 614-618. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768038/>.

[160] MENON R., TORTONI M. R., et al. Biomarkers of Spontaneous Preterm Birth: An Overview of The Literature in the Last Four Decades. *Reproductive Sciences*. 2011, vol. 18(11), s. 1046-1070. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22031189/>.

[161] KACEROVSKÝ M., DRAHOŠOVÁ M., et al. Interleukin 6 v plodové vodě pacientek s předčasným odtokem plodové vody. *Česká gynekologie*. 2009, vol. 74(6), s. 403-410. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-gynekologie/2009-6/interleukin-6-v-plodove-vode-pacientek-s-predcasnym-odtokem-plodove-vody-30864>.

[162] MUSILOVA I., BESTVINA T., et al. Vaginal fluid interleukin-6 concentrations as a point-of-care test is of value in women with preterm prelabor rupture of membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2016, vol. 215(5), s.611-619. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27402051/>.

- [163] ROBERT J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 2003, vol. 27(6-7), s. 449-464. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12697304/>.
- [164] HASLBECK M. Hsps and their role in the chaperone network. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002, vol. 59(10), s. 1649-1657. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12475175/>.
- [165] WELCH W. J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*. 1992, vol. 72(4), s. 1063-1081. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1438579/>.
- [166] TODRYK S. M., GOUGH M. J. et al. Facets of heat shock protein 70 shows immunotherapeutic potential. *Immunology*. 2003, vol. 110(1), s. 1-9. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1783014/>.
- [167] AREA A. Initiation of the immune response by extracellular HSP72. *Current Immunology Reviews*. 2006, vol. 2(3), s. 209-215. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17502920/>.
- [168] ZUGEL U., KAUFMANN S. H. Immune response against heat shock proteins in infectious disease. *Immunobiology*. 1999, vol. 201, s. 22-35.
- [169] PARK H., AHMI Y. et al. Expression of heat shock protein 70 in the thermally stressed antarctic clam *Laternula elliptica*. *Cell Stress Chaperones*. 2007, vol. 12(3), s. 275-282.
- [170] DING X. Z., FERNANDEZ-PRADA C. M., et al. Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte derived macrophages. *Cytokine*. 2001, vol. 16(6), s. 210-219. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11884024/>.
- [171] LEE W. C., WEN H. C., et al. Heat shock protein 72 overexpression proteins against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *Journal of Applied Physiology*. 2006, vol. 100(6), s. 2073-2082. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16627676/>.
- [172] FUKUSHIMA A., KAHARA H., et al. Changes in serum levels of heat shock protein 70 in preterm delivery and preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. * 2005, vol. 31(1), s. 72-77. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15669997/>.
- [173] WU T., TANGUAY R. M. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? *Cell Stress Chaperones*. 2006, vol. 11(1), s. 1-12. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1400608/>.
- [174] LUEWAN S., TEJA-INTR M., et al. Low maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A as a risk factor of preeclampsia. *Singapore Medical Journal*. 2017, vol. 59(1), s. 55-59. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28451695/>.
- [175] KALOUSKOVÁ M., MURAVSKÁ A., et al. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) and preeclampsia. *Advances in Clinical Chemistry*. 2014, vol. 63, s. 169-209. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24783354/>.
- [176] CAUGHEY A. B., ROBINSON J. N., et al. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2008, vol. 1(1), s. 11-22. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2492588/>.
- [177] COUSINS L. M., SMOK D., et al. AmniSure Placental Alpha Microglobulin-1 Rapid Immunoassay versus Standard Diagnostic Methods for Detection of Rupture of Membranes. *American Journal of Perinatology*. 2005, vol. 22(6), s. 317-320. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16118720/>.
- [178] CEKMEZ Y., KIRAN G., et al. Use of cervicovaginal PAMG-1 protein as a predictor of delivery within seven days in pregnancies at risk of premature birth. *BMC Pregnancy & Childbirth*. 2017, vol. 17(1), s. 246. Dostupné z: <https://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12884-017-1427-0>.

- [179] CIEŚLIK P., et al. Long pentraxin 3 (PTX3) in the light of its structure, mechanism of action and clinical implications. *Autoimmunity*. 2011, vol. 45(2), s. 119-128. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21988562/>.
- [180] PRESTA M., et al. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007, vol. 11(4), s. 723-738. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823252/>.
- [181] MULLER B., PERI G., et al. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Critical Care Medicine*. 2001, vol. 29(7), s. 1404-1407. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11445697/>.
- [182] BOTTAZZI B., et al. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. *The Journal of Hepatology*. 2016, vol. 64(6), s. 1416-1427. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5414834/>.
- [183] UniProtKB – P26022 (PTX3_HUMAN). *UniProt* [online]. Uniprot Consortium, 2020. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P26022>.
- [184] ORTEGA-HERNANDEZ O. D., BASSI N., et al. The Long Pentraxin 3 and Its Role in Autoimmunity. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2009, vol. 39(1), s. 38-54. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18614204/>.
- [185] GARLANDA C., BOTTAZZI B., et al. PTX3, a Humoral Pattern Recognition Molecule, in Innate Immunity, Tissue Repair, and Cancer. *Physiological Reviews*. 2018, vol. 98(2), s. 623-639. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5985957/>.
- [186] INTRONA V. V., ALLES M., et al. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*. 1996, vol. 87(5), s. 1862-1872. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8634434/>.
- [187] GARLANDA C., MAINA V., et al. The soluble pattern recognition receptor pentraxin-3 in innate immunity, inflammation and fertility. *Journal of Reproductive Immunology*. 2009, vol. 83(1), s. 128-133. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19900712/>.
- [188] RICHANI K., SOTO E., et al. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2005, vol. 17(4), s. 239-245. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16147832/>.
- [189] COZZI V., GARLANDA C., et al. PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR. *Placenta*. 2012, vol. 33(12), s. 1039-1044. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23062219/>.
- [190] GARG P., JARYAL A., et al. Estimation of asymmetric dimethylarginine (ADMA), placental growth factor 69 (PLGF) and pentraxin 3 (PTX 3) in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertension* 2018, vol. 14, s. 245-251. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29548740/>.
- [191] BASTEK J. A., ELOVITZ M. A. The role and challenges of biomarkers in spontaneous preterm birth and preeclampsia. *Fertility and Sterility*. 2013, vol. 99(4), s. 1117-1123. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23394778/>.
- [192] OSTWALD T. J., McLENNAN D. H. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 1974, vol. 249(3), s. 974-979. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4272851/>.
- [193] FIEGEL L., BURNS K., et al. Molecular cloning of the affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistr*. 1989, vol. 264(26), s. 21522-21528. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2600080/>.
- [194] WAISMAN D., SALIMATH B. P., et al. Isolation and characterization of CAB-63, a novel calcium-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1985, vol. 260(3), s. 1654-1660. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3968084/>.
- [195] MACER D. R. J., KOCH G. L. E. Identification of a set of calciumbinding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Science*. 1988. vol. 91, s. 61-70. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3253304/>.

- [196] VAN P. N., PETER F., et al. Four Intracisternal Calcium-binding Glycoproteins from Rat Liver Microsomes with High Affinity for Calcium. *Journal of Biological Chemistry*. 1989, vol. 264(29), s. 17494-17501. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818715214>.
- [197] LEWIS M. J., SALVATORE J. T., et al. Structure and Assembly of the Endoplasmic Reticulum. Biosynthetic Sorting of Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 1985, vol. 260(11), s. 6926-6931. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3922983/>
- [198] OPAS M., MICHALAK M., et al. Calreticulin. *Biochemical Journal*. 1992, vol. 285, s. 681-692. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1132847/?page=11>.
- [199] BRUNAGEL G., SHAH U., et al. Identification of calreticulin as a nuclear matrix protein associated with human colon cancer. *The Journal of Cellular Biochemistry*. 2003, vol. 89, s. 238-243. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12704787/>.
- [200] AROSA F. A., JESUS O., et al. Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, vol. 274(24), s. 16917-16922. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10358038/>.
- [201] KAGEYAMA S., ISONO T., et al. Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. *Clinical Chemistry*. 2004, vol. 50(5), s. 857-866. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14764641/>.
- [202] EGGLETON P., LLEWELLYN D. H. Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease. *The Scandinavian Journal of Immunology*. 1999, vol. 49(5), s. 466-473. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10320638/>.
- [203] WASER M., MESAELI N., et al. Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *Journal of Cell Biology*. 1997, vol. 138(3), s. 547-557. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2141645/>.
- [204] MICHALAK M., CORBETT E. F., et al. Calreticulin: one protein, one gene, many function. *Biochemical Journal*. 1999, vol. 344, s. 281-299. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220642/pdf/10567207.pdf>.
- [205] MATSUOKA K., SETA K. Covalent structure of bovine brain calreticulin. *Biochemical Journal*. 1994, vol. 298, s. 435-442. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1137959/>.
- [206] WATANABE D., YAMADA K., et al. Molecular cloning of a novel Ca(2+)-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, vol. 269, s. 7744-7749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925817373490>.
- [207] MENDLOVIC F., CONCONI M. Calreticulin: a Multifaceted Protein. *Nature Education*. 2010, vol. 4(1), s. 1. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/calreticulin-a-multifaceted-protein-14237270/>.
- [208] NAKAMURA K., ZUPPINI A., et al. Functional specialization of calreticulin domains. *Journal of Cell Biology*. 2001, vol. 154(5), s. 961-972. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2196195/>.
- [209] BAKSH S., MICHALAK M. Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca²⁺ binding domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1991, vol. 15, s. 21458-21465. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1939178/>.
- [210] MacLENNAN D. H., YIP C. C., et al. Isolation of Sarcoplasmic Reticulum Proteins. *Quantitative Biology*. 1972, vol. 37, s. 469-477. Dostupné z: <http://symposium.cshlp.org/content/37/469.extract>.
- [211] NAKHASI H. L., POGUE G. P., et al. Implications of calreticulin function in parasite biology. *Parasitology Today*. 1998, vol. 14, s. 157-160. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/med/17040734>.

- [212] KHANNA N. C., TOKUDA M., et al. Comparison of calregulins from vertebrate livers. *The Biochemical Journal*. 1987, vol. 242(1), s. 245-251. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/med/3593237>.
- [213] KHANNA N. C., WAISMAN D. M. Conformational changes induced by binding of divalent cations to calregulin. *Journal of Biochemical Chemistry*, 1986, vol. 261(19), s. 1078-1082. Dostupné z: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)84464-2/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)84464-2/fulltext).
- [214] FRIEDMAN B., PROCE J. L., Fiber systems in the olfactory bulb and cortex: a study in adult and developing rats, using the timm method with the light and electron microscope. *The Journal of Comparative Neurology*. 1984, vol. 223(1), s. 88-108. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6200515/>.
- [215] HELENIUS A., TROMBETTA E. S., et al. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends in Cell Biology*. 1997, vol. 7(5), s. 193-200. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892497010325>.
- [216] BEDARD K., SZABO E., et al. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *International Reviews of Cytology*. 2005, vol. 245, s. 91-121. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16125546/>.
- [217] COPPOLINO M., WOODSIDE M. J., et al. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature*. 1997, vol. 24, s. 843-847. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9126744/>.
- [218] DAI E., STEWART M., et al. Calreticulin, a potential vascular regulatory protein, reduces intimal hyperplasia after arterial injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997, vol. 17, s. 2359-2368. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.atv.17.11.2359>.
- [219] DE BRUYN M., WIERSMA V. R., et al. The ever-expanding immunomodulatory role of calreticulin in cancer immunity. *Frontiers in Oncology*. 2015, vol. 20(5), s. 35. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2015.00035/full>.
- [220] KRYSKO D. V., GARG A. D., et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012, vol. 12, s. 860-875. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23151605/>.
- [221] BARUAH P., DUMITRIU I. E., et al. C1q enhances IFN-gamma production by antigen-specific T cells via the CD40 costimulatory pathway on dendritic cells. *Blood*. 2009, vol. 113(15), s. 3485-3493. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19171874/>.
- [222] DUO C. C., GONG F. Y., et al. Soluble calreticulin induces tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin (IL)-6 production by macrophages through mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NFkappaB signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, vol. 15(2), s. 2916-2928. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3958890/>.
- [223] TAMBOR V., KACEROVSKY M., et al. Amniotic fluid cathelicidin in PPRM pregnancies: from proteomic discovery to assessing its potential in inflammatory complications diagnosis. *PLoS One*. 2012, vol. 7, s. 41164. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22815956/>.
- [224] KACEROVKY M., MUSILOVA I., et al. Amniotic fluid calreticulin in pregnancies complicated by the preterm prelabor rupture of membrans. *The Journal of Maternal-fetal and Neonatal Medicine*. 2016, vol. 29(24), s. 1-9. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/299460952_Amniotic_fluid_calreticulin_in_pregnancies_complicated_by_the_preterm_prelabor_rupture_of_membranes/citations.
- [225] GHIRAN I., KLICKSTEIN L. B., et al. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, vol. 278(23), s. 21024-21031. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12646570/>.

- [226] GU V. Y., WONG M. H., et al. Calreticulin in human pregnancy and preeclampsia. *Molecular Human Reproduction*. 2008, vol. 14(5), s. 309-315. Dostupní z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18417548/>.
- [227] JOHNSON S., MICHALAK M., et al. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends in Cell Biology*. 2001, vol. 11(3), s. 122-129. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11306273/>.
- [228] HOJRUP P., ROEPSTORFF P. et al. Human placental calreticulin characterization of domain structure and post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry*. 2001, vol. 268(9), s. 2558-2565. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11322874/>.
- [229] HUPPERTZ B., FRANK H. G., et al. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochemistry and Cell Biology*. 1998, vol. 110(5), s. 495-508. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9826129/>.
- [230] VILLAR J., ABDEL-ALEEM H., et al. World Health Organization Calcium Supplementation for the Prevention of Preeclampsia Trial Group. World Health Organization randomized trial of calcium supplementation among low calcium intake pregnant women. *Am American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2006, vol. 194(3), s. 639-649. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16522392/>.
- [231] PLOUFFE B. D., MURTHY S. K., et al. Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review. *Reports on Progress in Physics*. 2015, vol. 78(1). Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25471081/>.
- [232] HU X. G., PAN J. L., et al. Preparation and evaluation of solidphase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymers for trace analysis of tetracyclines in complicated samples. *Journal of Chromatography A*. 2008, vol. 1188, s. 97-107. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18325526/>.
- [233] ZHANG X. F., WANG R. M., et al. Preparation of Fe₃O₄ C layered double hydroxide composite for magnetic separation of uranium. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2013, vol. 52, s. 10152-10159. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie3024438>.
- [234] SHAO M. F., NING F. Y., et al. Preparation of Fe₃O₄ and SiO₂ layered double hydroxide core-shell microspheres for magnetic separation of proteins, *Journal of the American Chemical Society*. 2011, vol. 134, s. 1071-1077. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja2086323>.
- [235] MOSER A. C., HAGE D. S., Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis*. 2010, vol. 2(4), s. 769-790. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2903764/>.
- [236] BERENSMEIER S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, vol. 73(3), s. 495-504. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17063328/>.
- [237] FRANZREB M., SIEMANN-HERZBERG M., et al. Protein purification using magnetic adsorbent particles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, vol. 70, s. 505-516. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16496138/>.
- [238] ŠAFAŘÍK, I., ŠAFAŘÍKOVÁ, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagnetic Research and Technology*. 2004, 2(1), s. 7. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC544596/>.
- [239] YAVUZ C. T., PRAKASH J. T., et al. Magnetic separations: from steel plants to biotechnology. *Chemical Engineering Science*. 2009, vol. 64, s. 2510-2521. Dostupné z: https://www.academia.edu/13705681/Magnetic_separations_From_steel_plants_to_biotechnology.
- [240] SARASWAT M., MUSANTE L., et al. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. *BioMed research international*. 2013, s. 312709. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24455685/>.

- [241] TOH P. Y., YEAP S. P., et al. Magnetophoretic removal of microalgae from fishpond water: feasibility of high gradient and low gradient magnetic separation, *The Chemical Engineering Journal*. 2012, vol. 211, s. 22-30. Dostupné z: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201500095888>.
- [242] SHAO D. D., HU J., et al. Polyaniline multiwalled carbon nanotube magnetic composite prepared by Plasma-Induced graft technique and its application for removal of aniline and phenol. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010, vol. 114, s. 21524-21530. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Polyaniline-Multiwalled-Carbon-Nanotube-Magnetic-by-Shao-Hu/af2891bcd964189ddb78ab0f59ef849fe25cb201>.
- [243] LU A. H., SALABAS E. L., et al. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization and application. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, vol. 46(8), s. 1222-44. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200602866>.
- [244] PEČOVÁ M., ZAJONCOVÁ L., et al. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy*. 2011, vol. 105, s. 524-530. Dostupné z: <https://docplayer.cz/14844621-Biologicky-aktivni-latky-imobilizovane-na-magneticky-nosicich-a-jejich-vyuziti-v-biochemii-a-biotechnologii.html>.
- [245] HE J., HUANG M., et al. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, vol. 101, s. 84-101. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24809747/>.
- [246] COLOMBO M., CARRECAL-ROMERO M. F., et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*. 2012, vol. 41, s. 4306-4334. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cs/c2cs15337h>.
- [247] PAN B. F., GAO F., et al. Dendrimer modified magnetite nanoparticles for protein immobilization. *The Journal of Colloid and Interface Science*. 2005, vol. 284(1), s. 1-6. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15752777/>.
- [248] KRAJEWSKA B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004, vol. 35, s. 126. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Application-of-chitin-and-chitosan-based-materials-Krajewska/bcf7c5ece2a00c054dc1111e03a2e3ac20211df5>.
- [249] LI Y., ZHANG Y. M., et al. Functionalized magnetic nanoparticles for sample preparation in proteomics and peptidomics analysis, *Chemical Society Reviews*. 2013, vol. 42, s. 8517-8539. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/cs/c3cs60156k>.
- [250] ŠAFAŘÍK I., ŠAFAŘÍKOVÁ M. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: Overview of magnetic separations used in biochemical and biotechnological applications. 1997, s. 324-340. ISBN 978-1-4419-3283-9.
- [251] KIM H., HAGE D. Handbook of affinity chromatography: *Immobilization methods for affinity chromatography*. 2006, s. 35-78. ISBN 9780824740573.
- [252] KORTT A. S., ODDIE G. W., et al. Nonspecific amine immobilization of ligand can be a potential source of error in biacore binding experiments and may reduce binding affinities, *Analytical Biochemistry*. 1997, vol. 253, s. 103-111. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9356148/>.
- [253] JACKSON A. J., SOBANSKY M. R., et al. Principles and Applications of Immunoaffinity Chromatography, *Antibodies Applications and New Developments*. 2012, s. 156-174. Dostupné z: <https://experts.nebraska.edu/en/publications/principles-and-applications-of-immunoaffinity-chromatography>.
- [254] HERMANSON, Greg T. *Bioconjugate Techniques*. 2. USA: Elsevier. ISBN 0123822408, 9780123822406.
- [255] WATANABE E., YOSHIMURA Y., et al. Immunoaffinity column clean-up for the determination of imazalil in citrus fruits, *Analytica Chimica Acta*. 2001, vol. 433, s. 199-206. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267001007917>.

- [256] PFEIFFER N. E., WYLIER D. E., et al. Immunoaffinity chromatography utilizing monoclonal antibodies. Factors which influence antigen-binding capacity. *Journal of Immunological Methods*. 1987. vol. 97, s. 1-9. Dostupné z: <http://www.ijrpc.com/files/18-265.pdf>.
- [257] IBARRA N., CABALLERO A., et al. Comparison of different elution conditions for the immune purification of recombinant hepatitis B surface antigen. *Journal of Chromatography B*. 1999, vol. 735, s. 271-277. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378434799003564>.
- [258] SUBRAMANIAN A. Separation of atigens and antibodies by immunoaffinity chromatography. *Molecular Biotechnology*. 2002, vol. 20, s. 41-47. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2011.653493>.
- [259] SURESHKUMAR M., SISWANTO D. Y., et al. Magnetic antimicrobial nanocomposite based on bacterial cellulose and silver nanoparticles. *Journal of Material Chemistry*. [online]. 2010, vol. 20, s. 6948-6955. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/jm/c0jm00565g>.
- [260] UYTTENDAELE M., HOORDE VAN I., et al. The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of L. Monocytogenes in cheese, *International Journal of Food Microbiology*. 2000, vol. 54, s. 205-212. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10777071/>.
- [261] Chemicell – Products and Applications, SiMAG. *Chemicell.com* [online]. Chemicell GmbH, 2022. Dostupné z: <http://www.chemicell.com/products/protocols/index.html>.
- [262] KAUSAITE-MINKSTIMIENE A., et al. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. *Analytical chemistry*. 2010, vol. 82(15), s. 6401-6408. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20669994/>.
- [263] Cd-bioparticles – Protein Issolation. *Cd-bioparticles.com* [online]. CD Bioparticles Company. 2022. Dostupné z: https://www.cd-bioparticles.com/t/Protein-Isolation_48.html.
- [264] Elabscience – Biotin Labeling. *Elabscience.com* [online]. Elabscience Biotechnology Inc. 2009-2020. Dostupné z: <https://www.elabscience.com/List-detail-252.html>.
- [265] HENSLEY K. Detection of Protein Carbonyls by Means of Biotin Hydrazide–Streptavidin Affinity Methods. In: Kurien B., Scofield R. (eds) Detection of Blotted Proteins. *Methods in Molecular Biology*. 2015, vol. 1314. s. 586. ISBN: 9781493927173.
- [266] PHILLIPIS, Terry M. Analytical Techniques in Immunochemistry. CRC Press, 1991, s. 364. ISBN 0824784774, 9780824784775.