

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2022**

**Bc. Eliška Jará**

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**

**Optimalizace podmínek imunomagnetické separace pro záchyt  
pentraxinu 3, biomarkeru zánětu, ve vzorcích plodové vody**

**Bc. Eliška Jará**

**Diplomová práce**

**2022**

**University of Pardubice**  
**Faculty of Chemical Technology**

**Optimization of Immunomagnetic Separation Process to Capture  
Pentraxin 3, Biomarker of Inflammation, in Amniotic Fluid Samples**

**Bc. Eliška Jará**

**Thesis**

**2022**

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	<b>Bc. Eliška Jará</b>
Osobní číslo:	<b>C20472</b>
Studijní program:	<b>N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví</b>
Téma práce:	<b>Optimalizace podmínek imunomagnetické separace pro záchyt pentraxinu 3, biomarkeru zánětu, ve vzorcích plodové vody</b>
Téma práce anglicky:	<b>Optimization Of Immunomagnetic Separation Process To Capture Pentraxin 3, Biomarker Of Inflammation, In Amniotic Fluid Samples</b>
Zadávací katedra:	<b>Katedra biologických a biochemických věd</b>

## Zásady pro vypracování

Teoretická část bude obsahovat:

- 1) Stručný popis vývoje plodu v období 1. – 3. trimestru doplnit o popis fyziologie a patofyziologie plodové vody, jejího složení a vlastností v rámci celého těhotenství s fyziologickým průběhem; výčet komplikací spojených se změnou ve složení plodové vody a příčiny předčasného odtoku plodové vody u těhotných;
- 2) Definice zánětu z pohledu klinické imunologie, přehled významných biomarkerů zánětu, jejichž hladina v plodové vodě může stoupat (klesat) a mohou se tak stát indikátory počínajícího zánětu. Popis rozvoje infekčního a neinfekčního zánětu a jaké složky imunitního systému se do tohoto procesu zapojují. Jaké důsledky bývají s intraamniálními záněty spojovány nejčastěji.
- 3) Vymenujte a popište princip všech diagnostických metod používaných při podezření na předčasný odtok plodové vody. Uveďte biomarkery, které se v tomto období testují, použijte konkrétní příklady, kazuistiky spolu s interpretací naměřených výsledků.
- 4) Popište princip nově vyvíjené metody pro izolaci a průkaz biomarkerů zánětu v plodové vodě u žen s předčasným odtokem plodové vody – imunomagnetická separace biomarkeru na bázi proteinů, elektrochemická detekce biomarkeru v kombinaci s imunochemickými indikátory.

Experimentální část bude obsahovat dílčí kroky:

- 1) V rámci experimentální části se seznámte a prakticky si vyzkoušejte metodu elektroforetické separace proteinů (SDS-PAGE), techniku western-blot s imunodetekcí pro ověření reaktivity specifických protilátek s vybranými antigeny.
- 2) Naučte se práci s magnetickými částicemi, seznámte se s principy magnetické separace, proveďte různé způsoby vazby specifických IgG protilátek na povrch magnetických částic – vazba pomocí COOH sk., hydrazidové sk., pomocí proteinu A/G s kovalentní stabilizací. Elektroforeticky si ověřte účinnosti vazby a výsledky vyhodnoťte.
- 3) Pro přípravu imunosorbentu použijte nejprve modelový biospecifický pár dle zadání školitele, poté připravte vlastní imunosorbent pro specifickou izolaci vybraného biomarkeru, vyhodnoťte parametry nosiče – množství specifických IgG na částicích, vazebná kapacita nosiče. Experimentálně ověřte kompatibilitu vaší imunomagnetické separace s následnou elektrochemickou detekcí.

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

Seznam doporučené literatury:

K textu použít relevantní internetové zdroje, průběžně sledovat novinky v oboru.

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 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala paní prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za umožnění stát se součástí projektu, za všechny cenné rady během celého studia, a především za vedení této diplomové práce. Poděkování patří také doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za veškeré rady a pomoc v laboratoři, a také za její trpělivost. Opomenout nemohu ani paní laborantku Janu Kňavovou, které děkuji za pomoc i při zdravotních komplikacích a doktorandku Gylxhane Kastrati, MSc., které děkuji za pomoc s elektrochemickou částí práce a za oprášení anglického jazyka. Poslední poděkování patří mé rodině a nejbližším, bez jejichž podpory bych se neobešla.

## **SOUHRN**

Tato diplomová práce je součástí projektu PersonMed, který se zabývá vývojem multiplexního imunosenzoru sloužícího ke kvantifikaci biomarkerů zánětu v plodové vodě. Příčiny vzniku intraamniálního zánětu mohou být různé, například při předčasném odtoku plodové vody se otevírá cesta pro infekci. Zánět plodové vody se může objevit i bez přítomnosti infekce. Existuje vybraný počet prozánětlivých markerů, jejichž zvýšené hladiny včas upozorní na ohrožení plodu, ale i matky. Z tohoto důvodu je důležité prokázat případný vzniklý zánět již v počátku, a to i v minimálních koncentracích zánětlivých biomarkerů. Monitorace důležitých biomarkerů zánětu umožňuje včas ukončit těhotenství, pokud je ohrožen plod nebo matka. Cílem této práce bylo připravit imunosorbent na bázi magnetických částic a ověřit vhodné reakční podmínky pro záchyt biomarkeru zánětu, pentraxinu 3, v plodové vodě a stanovení jeho koncentrace pomocí imunosenzoru s elektrochemickou detekcí.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Intraamniální zánět, biomarker zánětu pentraxin 3, imunomagnetická separace, biofunkcionalizace magnetických částic, kvantové tečky, tištěné elektrody, elektrochemická detekce



## **SUMMARY**

This thesis is a part of a project PersonMed about developing a multiplex immunosensor to quantify biomarkers of inflammation in amniotic fluid. The causes of intra-amniotic inflammation can be different. For example, in the presence of premature outflow of amniotic fluid a pathway for infection is opened. But intraamniotic inflammation can occur even without the presence of infection. There is the number of pro-inflammatory markers whose elevated levels provide early warning of a threat of the fetus, but also to the mother. For this reason, it is important to detect inflammation early at minimal concentrations of inflammatory biomarkers. Monitoring of inflammatory biomarkers allows for timely termination of pregnancy if the fetus or mother is at risk. The aim of this study was to prepare immunosorbent based on magnetic particles and verify suitable conditions for the detection of inflammatory biomarker pentraxin 3 in amniotic fluid and its concentration determination using an immunosensor with electrochemical detection.

## **KEYWORDS**

Intra-Amniotic Inflammation, Biomarker of Inflammation Pentraxin 3, Immunomagnetic Separation, Biofunctionalization of Magnetic Particles, Quantum Dots, Screen-Printed Electrodes, Electrochemical Detection

# OBSAH

Seznam použitých zkratk	12
Seznam obrázků	14
Seznam tabulek	16
Úvod	17
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>18</b>
1.1 Aktivita imunitního systému matky v průběhu těhotenství	18
1.2 Vývoj imunitního systému plodu	18
1.2.2 Ovlivnění vývoje imunitního systému plodu a novorozence	20
1.3 Plodové obaly a plodová voda	21
1.4 Zánětlivý proces v děložní dutině	25
1.5 Biomarkery zánětu v plodové vodě	26
1.5.1 Interleukin 6	26
1.5.2 Kalretikulin	28
1.5.3 Pentraxin 3	29
1.5.4 Další biomarkery intraamniálního zánětu	30
1.6 Intraamniální zánět	36
1.6.1 Infekční intraamniální zánět	36
1.6.2 Neinfekční zánět	37
1.7 Metody pro průkaz biomarkerů zánětu v plodové vodě	38
1.7.1 Enzymová imunoanalýza (ELISA)	38
1.7.2 Multi-Analyte Profiling Technology (xMAP)	39
1.7.3 Imunochemické senzory kategorie POCT	40
1.7.3.1 Senzory na bázi magnetických částic	41
1.7.3.2 Senzory s elektrochemickou detekcí na bázi kvantových teček	43
<b>2 CÍL PRÁCE</b>	<b>46</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>47</b>
3.1 Biologický materiál	47
3.2 Přístroje	47
3.3 Pomůcky a materiál	48
3.4 Chemikálie	48
3.5 Magneticky aktivní mikročástice	50
3.6 Příprava roztoků	51
3.6.1 Pufry	51

3.6.2	Roztoky pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu .....	51
3.6.3	Barvení gelů .....	52
3.7	Metody .....	53
3.7.1	Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE) ....	53
3.7.2	Dot-blot .....	55
3.8	Vazba modelových protilátek na magnetické mikročástice.....	56
3.8.1	Vazba IgG protilátek na částice s karboxylovými funkčními skupinami .	56
3.8.2	Vazba IgG protilátek na částice s hydrazidovými funkčními skupinami .	57
3.8.3	Vazba IgG protilátek na částice s proteinem A .....	58
3.9	Výběr a vazba specifických protilátek na magnetické mikročástice .....	60
3.9.1	Purifikace specifických protilátek pomocí nosiče s proteinem A.....	60
3.9.2	Příprava imunosorbentů pro pentraxin 3 .....	60
3.10	Příprava konjugátu na bázi silika nanočástic a kvantových teček .....	63
3.11	Elektrochemický průkaz pentraxinu 3 v modelovém vzorku .....	64
3.12	Elektrochemický průkaz pentraxinu 3 v plodové vodě.....	65
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY a DISKUZE</b> .....	<b>66</b>
4.1	Způsoby vazby modelových IgG protilátek na magnetické částice .....	67
4.1.1	Vazba IgG na magnetické částice s karboxylovými skupinami .....	68
4.1.2	Vazba IgG na magnetické částice s hydrazidovými skupinami .....	71
4.1.3	Vazba IgG protilátek na magnetické částice s proteinem A.....	73
4.2	Výběr specifických monoklonálních protilátek .....	78
4.3	Příprava imunosorbentů pro pentraxin 3 .....	79
4.3.1	Imunosorbenty z magnetických částic s proteinem A .....	79
4.3.2	Imunosorbenty z magnetických částic s karboxylovými skupinami .....	82
4.4	Ověření funkce imunosorbentu pro záchyt pentraxinu 3 .....	85
4.4.1	Vhodné ředění plodové vody .....	87
4.4.2	Vhodný pufr pro ředění plodové vody.....	90
4.4.3	Průkaz pentraxinu 3 v plodové vodě.....	91
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>CITOVANÁ LITERATURA</b> .....	<b>94</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BMI	Body Mass Index
CCL3	Chemokinový ligand 3
CD	Diferenciační znaky (z angl. Cluster of Differentiation)
CRP	C-reaktivní protein (z angl. C-Reactive Protein)
ECM	Extracelulární matrix
EGF	Epidermální růstový faktor (z angl. Epidermal Growth Factor)
ELISA	Enzymová imunoanalýza (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
hCG	Lidský choriogonadotropin (z angl. Human Chorionic Gonadotropin)
hIgG	Nespecifické lidské IgG (z angl. Human IgG)
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Human Leucocyte Antigen)
HON	Hemolytické onemocnění novorozence
IAI	Intraamniální zánět (z angl. Intra-Amniotic Inflammation)
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major Histocompatibility Complex)
MIAC	Mikrobiální invaze do amniální dutiny (z angl. Microbial Invasion of The Amniotic Cavity)
MIP-1 $\alpha$	Makrofágový zánětlivý protein 1 $\alpha$ (z angl. Macrophage Inflammatory Protein 1 Alpha)
MMP	Matrixové metaloproteinázy (z angl. Matrix Metalloproteinases)
MPO	Myeloperoxidáza
MSC	Multipotentní mezenchymální kmenové buňky (z angl. Mesenchymal Stromal Cells)
NK buňky	Přirození zabíječi (z angl. Natural Killers)

PAPP-A	Specifický těhotenský Protein A (z angl. Pregnancy Associated Plasma Protein A)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
POCT	Testování u lůžka pacienta (z angl. Point of Care Testing)
PPROM	Předčasný odtok plodové vody (z angl. Preterm Premature Rupture of Membranes)
PRR	Receptory rozeznávající molekulové vzory (z angl. Pattern Recognition Receptors)
PTX3	Pentraxin 3
QD	Kvantové tečky (z angl. Quantum Dots)
Rh faktor	Rhesus faktor
SAP	Sérový amyloid P
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza s použitím dodecylsulfátu sodného (z angl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SiNPs-QD	Silika nanočástice s kvantovými tečkami (z angl. Silica Nanoparticles-Quantum Dots)
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (z angl. Single Nucleotide Polymorphism)
SPE	Sítotiskové elektrody (z angl. Screen-Printed Electrodes)
sTLR2	Solubilní forma Toll-like receptoru 2 (z angl. Soluble Toll-like Receptor 2)
SWASV	Anodická rozpouštěcí „square wave“ voltametrie (z angl. Square Wave Anodic Stripping Voltammetry)
TdT	Terminální deoxynukleotidyl transferáza
TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor beta (z angl. Transforming Growth Factor Beta)
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor alfa (z angl. Tumor Necrosis Factor Alpha)

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Plodové obaly</i> .....	21
<i>Obrázek 2: Hlavní proteiny lidské plodové vody v porovnání s lidskou plazmou</i> .....	23
<i>Obrázek 3: Struktura IL-6</i> .....	26
<i>Obrázek 4: Struktura kalretikulinu</i> .....	28
<i>Obrázek 5: Struktura pentraxinu 3</i> .....	29
<i>Obrázek 6: Schéma ELISA metody v sendvičovém uspořádání pro průkaz antigenu</i> .....	39
<i>Obrázek 7: Schéma xMAP metod pro multiplexní průkaz více analytů při jedné analýze</i> ..	40
<i>Obrázek 8: Využití magnetických částic v in vivo a in vitro diagnostice</i> .....	42
<i>Obrázek 9: Struktura kvantové tečky</i> .....	43
<i>Obrázek 10: Tištěná elektroda SPE pro elektrochemickou detekci</i> .....	44
<i>Obrázek 11: Výsledek elektrochemické detekce kvantových teček</i> .....	45
<i>Obrázek 12: Schéma pozic pro pipetování vzorku antigenu s kontrolami dot-blot</i> .....	55
<i>Obrázek 13: Schéma senzoru na bázi imunomagnetické separace s elektrochemickou detekcí</i> .....	66
<i>Obrázek 14: Schéma kovalentní vazby karboxylové funkční skupiny magnetické částice s aminovou funkční skupinou IgG molekuly</i> .....	68
<i>Obrázek 15: Analýza vazebných a promývacích frakcí po imobilizaci nespecifických hIgG na magnetické částice Dynabeads-COOH</i> .....	69
<i>Obrázek 16: Analýza elučních a promývacích frakcí po rozvolnění hIgG protilátek z magnetických částic Dynabeads-COOH na jednotlivé řetězce</i> .....	70
<i>Obrázek 17: Schéma kovalentní vazby hydrazidové funkční skupiny magnetické částice s oxidovanou IgG molekulou</i> .....	71
<i>Obrázek 18: Analýza vazebných a promývacích frakcí po imobilizaci nespecifických hIgG na magnetické částice SIMAG-Hydrazide</i> .....	72
<i>Obrázek 19: Schéma nekovalentní vazby magnetických částic s proteinem A a specifické IgG protilátky</i> .....	73
<i>Obrázek 20: Analýza vazebných a promývacích frakcí po imobilizaci anti-chymotrypsinových IgG protilátek na magnetické částice s proteinem A</i> .....	74
<i>Obrázek 21: Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě chymotrypsinu na anti-chymotrypsinové IgG protilátky vázané na magnetických částicích s proteinem A</i> .....	76
<i>Obrázek 22: Analýza štěpných a promývacích frakcí po štěpení ovalbuminu vázaným chymotrypsinem na anti-chymotrypsinových protilátkách</i> .....	77

<i>Obrázek 23: Vyhodnocení reaktivity klonů monoklonálních protilátek metodou dot-blot..</i>	78
<i>Obrázek 24: Afinita specifických protilátek k PTX3, metoda dot-blot .....</i>	78
<i>Obrázek 25: Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě specifických anti-PTX3 IgG molekul 6D9 z kultivačního média na magnetické částice s proteinem A .....</i>	79
<i>Obrázek 26: Analýza vazebných a elučních frakcí po izolaci IgG molekul 6D9 na kolonce s proteinem A .....</i>	80
<i>Obrázek 27: Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě izolovaných specifických anti-PTX3 IgG molekul 6D9 na magnetické částice s proteinem A .....</i>	81
<i>Obrázek 28: Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě specifických anti-PTX3 IgG molekul 1.1 (20 µg) na magnetické částice Dynabeads-COOH.....</i>	82
<i>Obrázek 29: Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě specifických anti-PTX3 IgG molekul 1.1 (50 µg) na magnetické částice Dynabeads-COOH.....</i>	83
<i>Obrázek 30: Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě specifických anti-PTX3 IgG molekul 1.1 (30 µg) na magnetické částice SIMAG-COOH.....</i>	84
<i>Obrázek 31: Schéma imunokomplexu k elektrochemické detekci.....</i>	85
<i>Obrázek 32: Schéma biokonjugátu sestávajícího ze silika nanočástic a kvantových teček vázaných na sekundární protilátky .....</i>	85
<i>Obrázek 33: Voltamogram analýzy plodové vody bez ředění – pozitivní a negativní vzorky .....</i>	88
<i>Obrázek 34: Voltamogram analýzy plodové vody ředěné 1:1 – pozitivní a negativní vzorky .....</i>	88
<i>Obrázek 35: Voltamogram analýzy ředěné plodové vody 1:4 – pozitivní a negativní vzorky .....</i>	89
<i>Obrázek 36: Voltamogram analýzy negativních vzorků plodové vody ředěných 1:4 v pufru PBS a TBT.....</i>	90
<i>Obrázek 37: Voltamogram analýzy spikované negativní plodové vody ředěné 1:1 .....</i>	91
<i>Obrázek 38: Lineární rozsah elektrochemické analýzy negativního vzorku plodové vody spikovaného PTX3 (5, 10 a 20 ng/ml).....</i>	92

## SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Hodnoty IL-6 v krvi a plodové vodě .....</i>	26
<i>Tabulka 2: Hodnoty kalretikulinu v krvi a plodové vodě.....</i>	28
<i>Tabulka 3: Hodnoty pentraxinu 3 v krvi a plodové vodě.....</i>	29
<i>Tabulka 4: Hodnoty C reaktivního proteinu v krvi a plodové vodě .....</i>	30
<i>Tabulka 5: Přehled použitých pufrů .....</i>	51
<i>Tabulka 6: Pipetované objemy pro přípravu polyakrylamidových gelů.....</i>	53
<i>Tabulka 7: Afinita protilátek k proteinu A.....</i>	75
<i>Tabulka 8: Výběr vhodného imunosorbentu na základě nespecifické sorpce biokonjugátu .....</i>	86
<i>Tabulka 9: Výsledky elektrochemické analýzy ředěné plodové vody .....</i>	87
<i>Tabulka 10: Výsledky elektrochemické analýzy spikované negativní plodové vody ředěné 1:1 .....</i>	91



## ÚVOD

Předčasný porod je v současné době považován za hlavní faktor novorozenecké morbidity a mortality. Jeho příčin může být mnoho, nejvíce se však na tomto patologickém stavu mohou podílet mikrobiální infekce nebo imunitní systém matky.

Fyziologicky je zánětlivá odpověď imunitního systému matky důležitá pro implantaci zárodku do buněk endometria a na konci těhotenství při fyziologickém porodu [1]. Při porodu uvolňují buňky vrozené imunity – makrofágy, neutrofilů a mastocyty – prozánětlivé faktory cytokiny, chemokiny nebo matrixové metaloproteinázy. Předčasná aktivace těchto zánětlivých procesů však může vést k předčasnému porodu [2].

Oproti tomu buňky specifické imunity – B lymfocyty a subpopulace T lymfocytů – se podílejí na udržování fetomaternální tolerance během těhotenství a jejich nadbytek či porucha funkce může vést k abortu, porodu časnému, nebo předčasnému [2].

Předčasný odtok plodové vody (PPROM) může být další možnou příčinou předčasného porodu tvořící asi třetinu všech případů. Je charakterizován jako porucha plodových obalů spojená s odtokem plodové vody před nástupem děložní aktivity, objevující se před 37. gestačním týdnem. Bývá často komplikován nepříznivými intraamniálními stavy, jakými je tzv. mikrobiální invaze do amniální dutiny (MIAC) nebo intraamniální zánět (IAI) [3].

Mikrobiální invaze do amniální dutiny může vést k intraamniálnímu zánětu, pokud do tohoto prostoru získají přístup bakterie nebo viry. V některých případech může dojít k intraamniálnímu zánětu i bez přítomnosti mikroorganismů a tento stav je označován jako sterilní intraamniální zánět [4]. Tyto zánětlivé komplikace probíhají v děložní dutině a v rané fázi nelze začínající zánět prokázat v krvi. Z tohoto důvodu není v diagnostice přínosné vyšetření C-reaktivního proteinu (CRP) v krvi matky, ale vyšetřuje se přímo plodová voda získaná aminocentézou [3].

Zánětlivý proces bez přítomnosti patogenů je důležitý fyziologicky pro implantaci zárodku a při porodu. Vzniknout ale může i zánětlivý proces, který je patologický. Ten vede nejčastěji k předčasnému odtoku plodové vody nebo předčasnému porodu. Pro plod je v případě mikrobiální invaze do děložní dutiny nebezpečný vznik novorozenecké sepsy. Na základě možnosti ohrožení plodu se v diagnostice usiluje o objevení nejvhodnější metody pro záchyt nejzávažnějších patologických stavů objevujících se v průběhu těhotenství. Hlavním cílem v diagnostice je především stanovení specifických biomarkerů zánětu již v počátku patologického stavu a v co nejmenších koncentracích.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Aktivita imunitního systému matky v průběhu těhotenství

Z imunologického hlediska je pro oplodnění vajíčka nejdůležitější seminální plazma. Její složení navozuje podmínky vhodné pro početí, dochází k útlumu efektorových subpopulací T lymfocytů a cytotoxických NK buněk budoucí matky [5].

V I. trimestru převažují Th1 lymfocyty podporující zánětlivou reakci důležitou pro nidaci vajíčka. V II. trimestru dochází k tzv. „cytokine shift“, kdy jsou naopak v převaze Th2 lymfocyty a navozuje se suprese zánětlivé reakce. Ve III. trimestru se navrácí převaha Th1 lymfocytů za účelem zánětlivé reakce související s porodem [6].

Zásadním krokem pro budoucí těhotenství je implantace embrya do děložní stěny, nejčastěji do oblasti zadní stěny dělohy [7]. Tento proces probíhá přibližně šestý den po oplození [8]. Pro toleranci mezi matkou a plodem jsou důležité dva faktory. Prvním je přítomnost bariéry mezi matkou a plodem, což omezuje kontakt imunitních buněk matky s tkání plodu. Druhým faktorem je absence HLA molekul (kromě HLA-C) na povrchu buněk trofoblastu a plod je tak chráněn před útokem CD8+ cytotoxickými T lymfocyty [9].

Nejdůležitějšími buňkami uplatňujícími se při nastavení tolerance vůči plodu jsou regulační T lymfocyty. Jejich množství stoupá úměrně délce těhotenství, maxima dosahují ve II. trimestru a od tohoto okamžiku naopak klesají až do termínu porodu. Tyto změny jsou ovlivněny hormonálními změnami během celého těhotenství [9].

## 1.2 Vývoj imunitního systému plodu

### *Vývoj imunitního systému plodu v I. trimestru*

Progenitory imunitních buněk plodu se nacházejí od 3. týdne ve žlutkovém vajíčku. Tyto primitivní buňky mohou být již od 4. týdne pozorovány v cirkulaci, odkud mohou migrovat do jater, která se po 5. týdnu stávají hlavním místem krvetvorby plodu [10]. Od 20. týdne se již krvetvorba přesouvá do kostní dřeně, kde se nachází po zbytek celého života [11].

B lymfocyty se objevují v játrech plodu přibližně v 9. týdnu. V průběhu jejich vývoje dochází k rekombinaci genových segmentů kódující finální strukturu protilátek [11]. V 7. týdnu vznikají v játrech plodu prothymocyty [10]. V 8. týdnu začínají osidlovat thymus,

který se vyvíjí z třetí faryngové výchlípký. Na tomto místě dochází k rekombinaci genových segmentů, které kódují polypeptidy vytvářející konečnou strukturu receptorů T lymfocytů (TCR). T lymfocyty vlastní TCR následně exprimují buď CD4 nebo CD8 molekuly, objevují se u plodu od 14. týdne těhotenství, kdy jsou již měřitelné [11].

Vznik a vývoj monocytů/makrofágů a dendritických buněk probíhá ve žloutkovém váčku od 3. týdnu těhotenství a pokračuje v játrech plodu. Neutrofilní granulocyty jsou u plodu pozorovatelné od 12. týdne těhotenství. Tyto buňky mají ve fetálním období sníženou schopnost fagocytózy, což je ale kompenzováno jejich zvýšeným počtem [11]. Předčasně narozené děti mají v krevním oběhu nižší počet cirkulujících neutrofilních granulocytů, proto jsou tito novorozenci více náchylní k infekcím a zvyšuje se i riziko celkové sepse vedoucí k úmrtí novorozenců [12]. NK buňky jsou pozorovány v cirkulaci plodu od 6. týdnu těhotenství, ale mají dočasně sníženou cytotoxickou aktivitu [11]. Ta může být způsobena nižším obsahem cytoplazmatických granul nebo nižší schopností degranulace [13].

Složky komplementu z krve matky neprochází placentární bariérou. V krvi plodu se objevuje až ve II. trimestru, ale má sníženou opsonizační schopnost i lytickou aktivitu. To může stejně jako snížená schopnost neutrofilů souviset s vyšší náchylností novorozenců k infekcím [13].

### ***Vývoj imunitního systému plodu ve II. trimestru***

B lymfocyty jsou nacházeny v lymfatických uzlinách a slezině plodu od 16. týdne [10]. Část protilátek IgG je transportována transplacentárně od matky, další část IgG tvoří B lymfocyty plodu [11]. Hladiny celkového IgG ale i plodového IgM se postupně zvyšují po 17. týdnu těhotenství. K největšímu nárůstu IgG dochází až do termínu porodu díky transplacentárnímu přenosu [10].

Dendritické buňky se objevují 23. týden v lymfatických uzlinách plodu a jako součást mukózní imunity. Tyto antigen prezentující buňky exprimují MHC molekuly méně než dospělí jedinci a také mají menší schopnost stimulovat T lymfocyty. Toto také souvisí s menší odolností novorozence vůči různým infekcím [11].

### ***Vývoj imunitního systému plodu ve III. trimestru***

V tomto období jsou již vytvořeny všechny buňky imunitního systému. Navzdory přítomnosti protilátek během intrauterinního života plodu mají novorozenci velmi nízké sérové IgM, nižší hladiny IgA a IgE. Převažuje IgG mateřského původu [11].

#### **1.2.2 Ovlivnění vývoje imunitního systému plodu a novorozence**

U podvyživených matek dochází k supresi imunitní odpovědi nejen samotné matky, ale i plodu. Způsobuje také významnou hypotrofii primárních i sekundárních lymfatických orgánů plodu. Naopak i u matek s hypernutricí a vysokým příjmem tuků může dojít k supresi imunitní odpovědi plodu [14].

Na vývoji imunitního systému plodu se mohou podílet i environmentální faktory. Při expozici plodu nikotinem dochází ke zvýšení hladin IgE v pupečnickové krvi. Ke zvýšení hladin IgE mohou přispívat i inhalační alergeny nebo stres matky [11].

Slizniční imunitní systém trávicího traktu se vyvíjí na základě kontaktu s bakteriemi. Bakteriální mikroflóra se v trávicím traktu utváří okamžikem narození a pokračuje a mění se výživou kojenců i během celého života [14]. Dle nových výzkumů bylo zjištěno, že děti narozené císařským řezem mohou mít následně v životě narušený imunitní systém kvůli nedostatečné expozici mateřským bakteriím, se kterými by se setkalo během porodu. Děti narozené císařským řezem také mívají odlišné složení střevního mikrobiomu než děti, které se narodily přirozenou cestou. Tyto rozdíly mizí mezi 6. až 9. měsícem života [15].

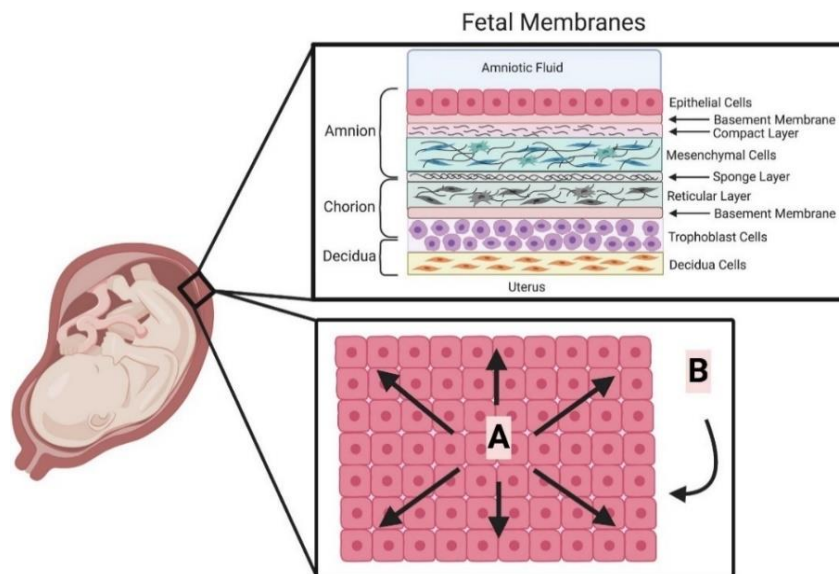
Po narození přetrvává část mateřských IgG protilátek v krevním oběhu novorozence, část protilátek dostává dítě v mateřském mléku. Vytváří se tak pasivní ochrana dítěte před infekcí, i když jeho imunitní systém nedosahuje zralosti dospělých jedinců. Předčasně narozené děti jsou vystaveny většímu riziku infekce z důvodu nezralého imunitního systému a sníženého množství protilátek od matky [15].

### 1.3 Plodové obaly a plodová voda

#### *Plodové obaly*

Plodové obaly jsou tvořeny dvěma blánami – amniionem a chorionem. Tyto blány vystupují z bazálního povrchu placenty a jsou vyplněny plodovou vodou, v níž dochází k vývoji plodu během těhotenství. Stejně jako placenta usnadňují plodové obaly výměnu plynů i odpadních látek a hrají také důležitou roli jako ochranné bariéry. Někdy je za třetí plodový obal považována decidua, která obklopuje plod zevně [16]. Složení plodových obalů znázorňuje obrázek 1.

Během porodu dochází fyziologicky k prasknutí těchto plodových obalů na základě působení biofyzikálních sil a biochemických změn v organismu matky i plodu (obrázek 1). Dojde-li k porušení obalů předčasně v různé fázi těhotenství, pak předčasný odtok plodové vody vede k abortu plodu nebo k předčasnému porodu. Předčasný odtok plodové vody může být spojen s rizikem infekce a zánětu v amniální dutině [17].



**Obrázek 1:** Plodové obaly (převzato z [17])

Ve spodním rámečku znázorněn apikální povrch epitelu amnionu zobrazující působení biofyzikálních sil:

- A) Lineární fyzikální síla způsobená vícesměrným napínáním plodových membrán.
- B) Dynamická fyzikální síla na plodové membrány v důsledku pohybů plodu, kontrakce a porodu.

### ***Plodová voda***

Plodová voda je tekutina vyplňující amniální dutinu a podporující vývoj plodu [18]. Mezi hlavní funkce plodové vody patří mechanismy fyzikální, funkční a homeostatické. Fyzikální mechanismy představují mechanickou ochranu plodu před vnějším prostředím a zajišťování vhodné teploty. Funkčním mechanismem je především polykání plodové vody, její vstřebávání a následné vyloučení fetálními ledvinami, dále i pohyb kosterního svalstva plodu. Homeostatickými mechanismy je myšleno zachování integrity amnionu a boj proti infekci [19].

Složení plodové vody úzce souvisí s vývojem plodu během těhotenství. Plodová voda se proto využívá v prenatalní diagnostice. Pomocí aminocentézy lze získat vzorek plodové vody a použít k biochemickému, genetickému, molekulárnímu nebo mikrobiálnímu vyšetření. Mezi nejčastější indikace k aminocentéze patří diagnostika chromozomálních abnormalit, monogenně dědičných chorob, infekcí plodu a intraamniálního zánětu. Toto vyšetření poskytuje i další informace, např. o zralosti plic plodu nebo přítomnosti fetální hemolýzy při Rh inkompatibilitě [20].

### **Složení plodové vody**

Plodová voda, jak již bylo zmíněno dříve, je tekutina v amniální dutině poskytující mechanickou ochranu, živiny a další molekuly potřebné pro vývoj plodu. Během embryogeneze je plodová voda tvořena mateřskou plazmou. Od 10. týdnu se stává složení plodové vody podobné fetální plazmě (obrázek 2) [21]. Po 20. týdnu dochází ke keratinizaci kůže plodu a tato obousměrná difúze již není možná. V tomto období je cirkulace plodové vody zajišťována produkcí moči a sekretu z dýchacích cest s následným polykáním této plodové vody [18].

Hlavní složkou plodové vody je především voda. Dále obsahuje sacharidy, lipidy, proteiny, peptidy a hormony. Důležitá je přítomnost glukózy a dalších látek nezbytných pro metabolismus a výživu plodu [21]. Kromě fyziologicky přítomných proteinů se v plodové vodě mohou objevit i další proteiny, jejichž přítomnost může souviset s výskytem vývojových a chromozomových abnormalit, se vznikem zánětu či infekce. Analýzou složení plodové vody lze také určit průběh maturace plicní tkáně [22].

Amniotic fluid proteome <sup>a</sup>		Rank	Plasma proteome (13)	
Gene	Protein		Gene	Protein
<i>ALB</i>	Albumin	1	<i>ALB</i>	Albumin
	Immunoglobulins	2		Immunoglobulins
<i>FN1</i>	Fibronectin	3	<i>TF</i>	Serotransferrin
<i>TF</i>	Serotransferrin	4	<i>FG</i>	Fibrinogen
<i>C3</i>	Complement C3	5	<i>AMBP</i>	$\alpha_1$ -Microglobulin
<i>SERPINA1</i>	$\alpha_1$ -Antitrypsin	6	<i>SERPINA1</i>	$\alpha_1$ -Antitrypsin
<i>CP</i>	Ceruloplasmin	7	<i>C3</i>	Complement C3
<i>AFP<sup>b</sup></i>	$\alpha$ -Fetoprotein	8	<i>HP</i>	Haptoglobin
<i>GC</i>	Vitamin D-binding protein	9	<i>APOA1</i>	Apolipoprotein A-I
<i>POSTN</i>	Periostin	10	<i>APOB</i>	Apolipoprotein B
<i>APOA1</i>	Apolipoprotein A-I	11	<i>ORM1</i>	$\alpha_1$ -Acid glycoprotein
<i>SERPINC1</i>	Antithrombin III	11/12		Lipoprotein
<i>TGFBI</i>	Transforming growth factor $\beta$ -induced protein ig-h3 precursor	13	<i>CFH</i>	Factor H
<i>AMBP</i>	$\alpha_1$ -Microglobulin	14	<i>CP</i>	Ceruloplasmin
<i>PLG</i>	Plasminogen	15	<i>C4</i>	Complement C4

**Obrázek 2:** Hlavní proteiny lidské plodové vody v porovnání s lidskou plazmou (převzato z [21])

Důležitou roli pro fyziologický vývoj plodu hrají i vitaminy v plodové vodě. Vitamin C a vitamin E mají antioxidační účinek na počátku těhotenství, snížená hladina vitamínu C bývá pozorována u matek kuřáček. Vitamin A s jeho vazebným proteinem bývá zvýšen hlavně u matek, jejichž plod vykazuje vývojovou vadu, nebo u matek s diabetem či hypertenzí. Důležitým vitamínem je vitamin B12, jehož hodnoty jsou během těhotenství trvale zvýšené a jehož nedostatek spolu s nedostatkem kyseliny listové může souviset s defekty neurální trubice [22].

Součástí plodové vody jsou i buňky plodu uvolňované během jeho vývoje a zrání. Například multipotentní mezenchymální kmenové buňky tvoří přibližně 1 % všech buněk nacházejících se v plodové vodě ve třetím trimestru [23]. Dalšími typy buněk, které jsou uvolňovány z plodu do plodové vody jsou kožní buňky a buňky trávicího, dýchacího a močového traktu [24].

### Patofyziologie plodové vody

V plodové vodě se mohou za určitých okolností objevit i látky, které mohou být pro plod škodlivé. Za nejvíce znepokojující situaci je považováno uvolnění mekoniumu plodu do plodové vody, nejčastěji způsobené fetální hypoxií. V plodové vodě jsou pak přítomny žlučové pigmenty či střevní enzymy [18].

V plodové vodě se může objevit vysoká hladina nekonjugovaného bilirubinu. V tomto případě může být plodová voda zbarvena do žluta. K tomuto stavu dochází především při inkompatibilitě antigenů fetálních erytrocytů a antigenů exprimovaných na mateřských erytrocytech. Nejčastěji bývá tento stav způsoben inkompatibilitou matky a plodu v Rh systému, objevit se může také inkompatibilita v AB0 systému či vzácně inkompatibilita

dalších krevních skupinových systémů, například Kell nebo Duffy. Takto vzniklá inkompatibilita je v současnosti označována jako tzv. hemolytické onemocnění novorozence (HON), dříve se ale pro toto onemocnění používal název fetální erythroblastóza [25].

V plodové vodě je za určitých okolností možné detekovat mikroorganismy, které souvisejí s mikrobiální invazí do amniální dutiny (MIAC). Kultivací potvrzený MIAC bývá spojen s vysokou mírou perinatální morbidity, mortality a s předčasným porodem. V některých případech se i přes negativní výsledek kultivace u žen s předčasným porodem rozvíjí intraamniální zánět, který lze prokázat přítomností biomarkerů zánětu v plodové vodě bez přítomnosti mikroorganismů [26].

Docházet může i ke změně objemu plodové vody: oligohydramnion nebo polyhydramnion. Oligohydramnion můžeme charakterizovat jako snížený objem plodové vody, který může být spojen s její sníženou tvorbou, předčasným odtokem nebo při poruše vývoje ledvin plodu. Naopak polyhydramnion znamená zvýšený objem plodové vody, který se objevuje především u polyurie způsobené abnormalitami ledvin, gestačním diabetem nebo poškozením mozku plodu [19].

### **Předčasný odtok plodové vody (PPROM)**

Jedná se o patologickou rupturu plodových obalů před 37. týdnem gestace [27]. Vzniknout může jako důsledek mikrobiální invaze do amniální dutiny s rozvojem intraamniálního zánětu [28]. V některých případech se intraamniální zánět rozvíjí i bez přítomnosti mikrobiálních agens.

Nejčastější komplikací je předčasný porod. Pokud k němu dojde příliš brzy v nízkém gestačním věku, mohou se u novorozenců objevit komplikace vzhledem k nezralosti novorozence. Těmi může být nekrotizující kolitida, syndrom dechové tísně novorozence, neurologické postižení nebo oligohydramnion. Někdy může být tento stav pro plod až letální [29].

Rizikové faktory pro vznik PPRM můžeme rozdělit na 3 části: maternální, fetální a uteroplacentární. Mezi rizikové faktory ze strany matky patří především PPRM v předchozím těhotenství, léčba steroidy, kouření či nízké BMI. Z rizikových faktorů ze strany plodu se jedná hlavně o vícečetné těhotenství, tzn. komplikace především u těhotenství s dvojčaty. Mezi uteroplacentární rizikové faktory patří abrupce placenty, intraamniální infekce, anomálie dělohy nebo polyhydramnion [30].



## 1.4 Zánětlivý proces v děložní dutině

Zánět obecně je důležitým procesem pro udržování homeostázy organismu. To znamená, že se jedná o fyziologický proces vzniklý na základě narušení homeostázy ve snaze napomoci reparaci tkání po infekci či poranění [31]. Jak již bylo zmíněno v úvodu, je zánětlivá odpověď imunitního systému matky nezbytná pro implantaci zárodku do buněk endometria a při porodu [1].

Imunitní buňky matky nejsou v místě implantace přítomny z důvodu imunitní odpovědi proti cizorodé tkáni, ale jsou chemotakticky přitahovány do tohoto místa za účelem uchycení zárodku do děložní stěny. Nedochozí tak k supresi imunitního systému matky v děložní dutině, ale naopak zůstává imunitní systém matky aktivní a obezřetně kontrolován [32]. Hlavním faktorem pro udržení fyziologického těhotenství je převaha Th2 lymfocytů (tzv. Th2 fenomén). Přítomnost patologických zánětlivých procesů vychyluje rovnováhu mezi Th1 a Th2 opačně směrem k Th1, což může způsobit potrat nebo předčasný porod [31].

Na stavu imunitního systému matky během těhotenství se mohou podílet také hormony. Estrogeny zajišťují stimulaci protizánětlivých Th2 lymfocytů a inhibici prozánětlivých Th1 lymfocytů. V přítomnosti intraamniální infekce nebo zánětu dochází ke snížení funkce progesteronu a tím ke zvýšení prozánětlivých cytokinů. Relaxin je hormon, který také může ovlivnit produkci prozánětlivých cytokinů. Tyto prozánětlivé cytokiny mohou vést až k předčasnému porodu či vzniku PPRM [31].

## 1.5 Biomarkery zánětu v plodové vodě

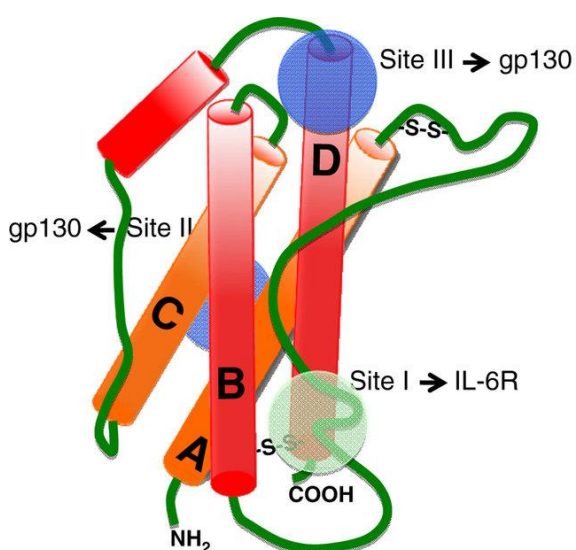
V plodové vodě se mohou objevovat látky, jejichž přítomnost svědčí o probíhající infekci či zánětu. Takové látky nazýváme biomarkery. Jejich stanovení napomáhá určit míru a fázi zánětu [22]. Významným biomarkerem zánětu v plodové vodě je cytokin IL-6, ale vyšší počet falešně pozitivních výsledků vede k identifikaci dalších vhodných biomarkerů pro přesnou predikci intraamniálního zánětu s předčasným porodem [33].

### 1.5.1 Interleukin 6

*Tabulka 1: Hodnoty IL-6 v krvi a plodové vodě (zdroje: [26], [34])*

	Fyziologická hodnota	Patologická hodnota
<b>Krev</b>	<5 pg/ml	>5 pg/ml
<b>Plodová voda</b>	<2,6 ng/ml	>2,6 ng/ml

Interleukin 6 (IL-6) je prozánětlivý cytokin o velikosti přibližně 25 kDa dle post-translačních modifikací, jehož gen se nachází se na 7. chromozomu v oblasti p15-p21. Tento gen se skládá ze čtyř intronů a pěti exonů, kóduje prekurzor interleukinu skládajícího se z 212 aminokyselin, z něhož tvoří 28 aminokyselin signální sekvenci. Konečný IL-6 je jednoretězcový glykoprotein, který je tvořen čtyřmi  $\alpha$ -helixy [35], (obrázek 3) [36].



**Obrázek 3:** Struktura IL-6 (převzato z [36])

Interleukin 6 je produkován hlavně T lymfocyty aktivujícími B lymfocyty v efektorové buňky [37]. Také může být produkován i monocyty s makrofágy, endoteliálními buňkami, adipocyty a v některých případech i nádorovými buňkami. Indukuje expresi řady proteinů akutní fáze a má důležitou roli v indukci proliferace a diferenciaci buněk [34]. Pokud dojde k syntéze IL-6 v počáteční fázi zánětu, dostává se krevním oběhem do jater, kde dochází k rychlé indukci proteinů akutní fáze (fibrinogen, CRP, haptoglobin, sérový amyloid A), ale naopak ke snížení tvorby albuminu, fibronektinu a transferinu [38].

IL-6 se v plodové vodě nachází fyziologicky ve velmi nízkých koncentracích. Při zánětlivé reakci v děložní dutině ale dochází k jeho zvýšenému uvolňování do plodové vody ze zánětlivé tkáně. Takto zvýšené hladiny jsou významným biomarkerem zánětu plodové vody. Tento cytokin vykazuje vysokou až 80 % citlivost pro predikci infekce či zánětu v plodové vodě. Jedinou nevýhodou je míra falešně pozitivních výsledků, která může být až 20 % [33]. V současné době stále nejsou definovány hraniční hodnoty IL-6 pro stanovení intraamniálního zánětu či infekce. Z toho důvodu se doporučuje, aby diagnostika probíhala v kombinaci s dalšími parametry [39].

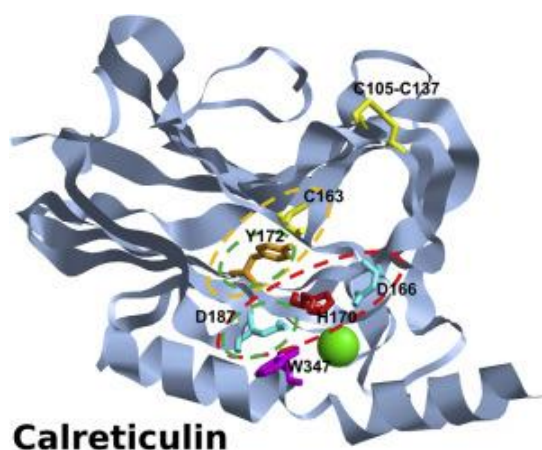
Výzkum provedený v USA (Velez, a kol., 2007, [40]) odhalil, že exprese genu pro IL-6 závisí také na etnické příslušnosti. Výzkum byl prováděn u dvou etnických menšin: afroamerické a evropské. Bylo zjištěno, že rozdílná exprese IL-6 je dána genetickými odchylkami v genech pro IL-6 a jeho receptor IL-6R. Konkrétně se jedná o odlišnosti v promotorových variantách těchto genů. Vyšší koncentrace IL-6 v plodové vodě je spojena s jednonukleotidovým polymorfismem (SNP) nacházeným u předčasného porodu, který koreluje s mikrobiální invazí do amniální dutiny. Z toho vyplývá, že ženy afroameričanky a evropanky reagují na infekci odlišnou mírou exprese IL-6 [40].

## 1.5.2 Kalretikulin

*Tabulka 2: Hodnoty kalretikulinu v krvi a plodové vodě (zdroje: [41], [42])*

	Fyziologická hodnota	Patologická hodnota
<b>Krev</b>	<1,8 ng/ml	>1,8 ng/ml
<b>Plodová voda</b>	<32,6 ng/ml	>32,6 ng/ml

Kalretikulin (obrázek 4) [43] je vápník vázající protein o velikosti 47 kDa, který je kódován genem *CALR*. Jedná se o protein typu chaperonu. CLR má v imunitním systému několik funkcí, které zahrnují například usnadnění skládání molekul MHC I. třídy v endoplazmatickém retikulu [42]. Za normálních okolností se CLR vyskytuje hlavně v matrix endoplazmatického retikula, ale může se nacházet i na povrchu některých buněk, například neutrofilů [41]. Strukturně je podobný kalnexinu, který je také chaperonem, ale kotveným k membráně endoplazmatického retikula, na rozdíl od rozpustného kalretikulinu [42]. Kromě funkce v imunitním systému plní kalretikulin i jiné funkce, například ovlivňuje genovou expresi nebo adhezi buněk. Tento chaperon se uplatňuje jak ve fyziologických, tak i patologických procesech. V tělesných tekutinách se zvyšuje především u patologických stavů spojených s infiltrací tkání neutrofilů [41].



*Obrázek 4: Struktura kalretikulinu (převzato z [43])*

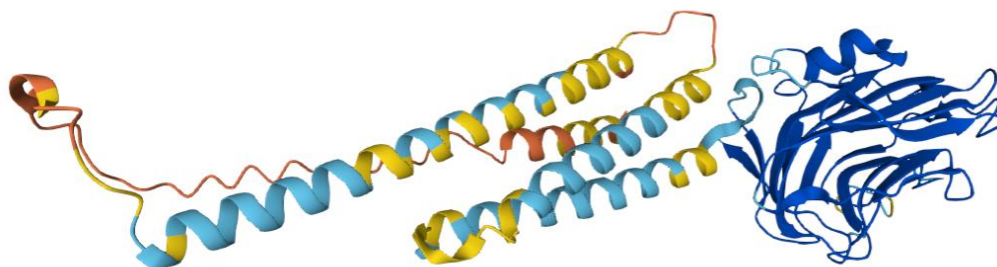
Úloha CLR při PPRM dosud není známa. Musilová, a kol. [41] zjistili, že zvýšená hladina tohoto biomarkeru se nachází: více u žen s MIAC než bez MIAC, pozitivně koreluje s mikrobiální dávkou *Ureaplasma species*, pozitivně koreluje s koncentrací IL-6 a vyšší hladina se nachází i u žen s intraamniálním zánětem především spojeným s infekcí [41].

### 1.5.3 Pentraxin 3

*Tabulka 3: Hodnoty pentraxinu 3 v krvi a plodové vodě (zdroj: [44])*

	Fyziologická hodnota	Patologická hodnota
<b>Krev</b>	<2 ng/ml	>2 ng/ml
<b>Plodová voda</b>	<0,55 ng/ml	>0,55 ng/ml

Pentraxin 3 (PTX3) (obrázek 5) je glykoprotein akutní fáze o velikosti 41 kDa, který je exprimován genem *PTX3* nacházejícím se na 3. chromozomu v oblasti q25 a skládá se ze tří exonů [45]. Tento protein je receptor rozeznávající molekulové vzory, tzv. PRR.



*Obrázek 5: Struktura pentraxinu 3 (převzato z [43])*

Pentraxiny obecně jsou základní složkou humorální vrozené imunity. Konkrétně pentraxin 3 je syntetizován různými typy buněk, jako jsou fagocyty, lymfocyty, dendritické buňky, ale i fibroblasty a endoteliální buňky. Jeho hlavní funkcí je rozpoznávat a opsonizovat mikroorganismy (houby, viry, bakterie) a navíc aktivovat komplement. Z toho důvodu je považován za protein akutní fáze, protože ke zvýšení jeho hladiny dochází hlavně při zánětlivém procesu [44]. Fyziologicky je součástí plodové vody, jeho tvorba probíhá v placentě, amniovém epitelu a chorionu [46].

Pentraxin 3 se nachází i v plazmě matky. Jedná se o protein přítomný fyziologicky během všech tří trimestrů gravidity, jeho hladiny se však v průběhu těhotenství mění. Hladina PTX3 v plazmě matky stoupá úměrně gestačnímu věku, k výraznému zvýšení v mateřské plazmě dochází při předčasném porodu či v termínu porodu, kdy dosahuje hodnot až 0,55 ng/mL. Nebyla zjištěna spojitost mezi zvýšením hladin v mateřské plazmě a přítomností intraamniálního zánětu, tzn. že v přítomnosti infekce či zánětu jsou změny v hladinách pentraxinu 3 zachytilelné pouze v plodové vodě [47].

Tento protein se vyskytuje v granulech neutrofilů. Jeho uvolnění do extracelulárního prostoru probíhá v reakci na infekci nebo poškození tkáně. K tomuto uvolnění dochází okamžitě po obdržení signálu. Na rozdíl od CRP je produkován několika typy buněk a působí lokálně, kdežto CRP produkují pouze hepatocyty a působí systémově [46]. Ke zvýšení pentraxinu 3 v plodové vodě dochází v přítomnosti intraamniálního zánětu a pozitivně koreluje s koncentrací IL-6 [44].

#### 1.5.4 Další biomarkery intraamniálního zánětu

##### *C reaktivní protein*

**Tabulka 4:** Hodnoty C reaktivního proteinu v krvi a plodové vodě (zdroje: [48], [49])

	Fyziologická hodnota	Patologická hodnota
<b>Krev</b>	<10 mg/l	>10 mg/l
<b>Plodová voda</b>	<2 mg/l	>2 mg/l

C reaktivní protein (dále jen CRP) je považován za hlavní protein akutní fáze, který stejně jako pentraxin 3 patří do rodiny pentraxinů [50]. U pacientů s akutní pneumokokovou pneumonií byla objevena látka, která v kombinaci s polysacharidem C buněčné stěny pneumokoků vytvářela precipitát. Z tohoto důvodu byla látka pojmenována jako C reaktivní protein [51]. Jeho funkce se podílí na fungování vrozené imunitní odpovědi tím, že aktivuje komplement, zprostředkovává fagocytózu a produkuje další prozánětlivé cytokiny. Váže se na polysacharidy přítomné na bakteriích, ale i parazitech a houbách. Takto vzniklé komplexy se váží na Fc receptor fagocytujících buněk, vázat se mohou ale i na C1q složku komplementu [48].

Při poškození tkání dochází k produkci prozánětlivých cytokinů (především IL-6, ale i IL-1 a TNF- $\alpha$ ), které stimulují produkci proteinů akutní fáze v játrech, včetně CRP [48]. Tvořen může být i endoteliálními buňkami, adipocyty nebo buňkami hladké svaloviny [49]. Vysoké koncentrace jsou nacházeny u invazivních bakteriálních infekcí, proto je CRP používán jako marker zánětu bakteriálního původu. Ke zvyšování hladiny dochází již po 4-6 hodinách od vyvolání zánětu [48].

CRP je hojně využíván v perinatologii jako biomarker zánětu v intraamniální dutině. Vyšší hladiny CRP v plodové vodě jsou nacházeny nejen u intraamniálního zánětu, ale i u MIAC [50]. Jedná se především o systémově působící látku [46]. Jelikož ale intraamniální zánět probíhá lokálně v děloze, nekoreluje hladina CRP v plodové vodě a v mateřském séru.

Z tohoto důvodu není výhodné stanovovat hladinu CRP z mateřského séra při diagnostice zánětlivého procesu. Lepší je využít metodu aminocentézy pro získání plodové vody, která je pro toto stanovení vhodnější [3].

### ***Makrofágový zánětlivý protein 1 $\alpha$***

Makrofágový zánětlivý protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), označován také jako CCL3 (chemokinový ligand 3), patří do skupiny chemokinů důležitých pro rozvoj imunitní reakce a zánětu. Produkován může být většinou imunitních buněk, hlavně makrofágů, jako reakce na prozánětlivé signály. Jedná se o silný chemoatraktant vrozené i získané imunity, který přitahuje buňky imunitního systému do místa určení [52]. MIP-1 $\alpha$  se váže na chemokinové receptory CCR1 a CCR5 na základě kterých může být tímto chemoatraktantem přitahováno více buněk [53]. V důsledku deregulace tohoto procesu dochází k vyšší náchylnosti jedince k infekcím [52]. Jeho hlavní funkcí je nejen přitahování imunitních buněk do místa zánětu, ale účastní se i dalších procesů, například hojení ran nebo destrukce kosti [53].

MIP-1 $\alpha$  v plodové vodě může být použit jako další biomarker pro diagnostiku zánětlivého procesu v děložní dutině objevující se v řádu pikogramů. Zvýšená koncentrace se objevuje především u žen s intraamniální infekcí nebo zánětem. Zároveň se objevuje zvýšená hladina i u předčasného porodu na rozdíl od porodu v termínu [54].

### ***Solubilní Toll-like receptor 2***

Solubilní Toll-like receptor 2 (sTLR2) je protein patřící do skupiny Toll-like receptorů, což jsou transmembránové receptory mající klíčovou roli ve vrozené imunitě, které rozpoznávají tzv. molekulové vzory asociované s patogeny (PAMPs). PAMPs jsou složky bakteriální stěny, například peptidoglykany, glykolipidy, lipoproteiny apod. U člověka bylo objeveno 10 těchto TLR receptorů. Na rozhraní mezi matkou a plodem jsou tyto receptory exprimovány na buňkách hemoplacentární bariéry, v imunitních buňkách, ale i v deciduálních buňkách a v trofoblastu. Aktivace TLR2 způsobuje produkci antimikrobiálních peptidů a proteinů, cytokinů a chemokinů [55].

Bylo zjištěno, že sTLR2 je stálou součástí plodové vody ve dvou izoformách, kde se podílí na regulaci zánětlivé odpovědi na patogeny. Jejich koncentrace se mění v závislosti na gestačním věku. Vysoké hladiny sTLR2 před 30. týdnem těhotenství jsou spojeny s přísnější kontrolou zánětlivé reakce v počátku těhotenství. Právě v tomto období vzniká většina předčasných porodů na základě přítomnosti infekce nebo zánětu. Funkce a množství sTLR2 moduluje intenzitu intraamniálního zánětu způsobeného gram pozitivními bakteriemi. Dulay, a

další [55] zjistili, že míra intraamniální zánětlivé reakce je nižší v případě grampozitivních bakterií, na rozdíl od bakterií gramnegativních. Tento nálezn potvrzuje fakt, že infekce plodu G- bakteriami vede ve srovnání s infekcí G+ bakteriami k vyšší mortalitě a morbiditě.

Patologicky zvýšená hladina tohoto biomarkeru v plodové vodě bývá nacházena v přítomnosti MIAC a chorioamnionitidy, nezávisle na gestačním věku. Může korelovat s mikrobiální dávkou v mykoplazmat [56].

### ***Katepsin G***

Katepsin G je serinová proteáza objevující se především v azurofilních granulech neutrofilních granulocytů, ale nacházet se může i v monocytech, B lymfocytech a dendritických buňkách. Jelikož je uchovávan v primárních granulech, uvolňuje se až po stimulaci imunitními komplexy, fagocytózou nebo farmakologickými látkami. Jako všechny výše zmíněné biomarkery má i katepsin G schopnost regulovat zánět. Na vzniku zánětu se uplatňuje jeho schopnost podpořit migraci monocytů, neutrofilů a antigen prezentujících buněk tím, že proteolyticky zpracovává a přeměňuje chemokiny na silnější chemotaktické faktory [57]. Proteolytické štěpení touto serinovou proteázou je podobné chymotrypsinu a trypsinu. To znamená, že je schopen štěpit peptidovou vazbu [58]. Mimo imunitní systém se uplatňuje při trombogenezi nebo při ovlivnění krevního tlaku [57].

Katepsin G v kombinaci s reaktivními formami kyslíku a myeloperoxidázou se podílí na usmrcování fagocytovaných mikroorganismů, dochází tak ke zvýšení jeho koncentrace v přítomnosti MIAC. Zvýšená koncentrace v plodové vodě je nacházena i u žen s intraamniálním zánětem a pozitivně koreluje s koncentrací IL-6 v plodové vodě [59].

### ***Matrixová metaloproteináza 8***

Matrixová metaloproteináza 8 (MMP-8) je nejvýznamnějším členem ze skupiny matrixových metaloproteináz, které zahrnují přibližně 25  $Zn^{2+}$  dependentních proteáz. MMP-8 může být také známa pod názvem neutrofilní kolagenáza či kolagenáza-2. Název neutrofilní kolagenázy byl odvozen na základě domněnky, že je exprimována pouze v prekurzorech neutrofilních granulocytů. Dnes již víme, že exprimována může být jakýmikoli imunitními buňkami v průběhu zánětlivého procesu a je důležitou složkou akutního i chronického zánětu. Stejně jako ostatní enzymy je MMP-8 sekretována jako neaktivní proenzym, který musí být pro svou funkci proteázy aktivován. Aktivace může probíhat účinkem jiných proteáz, nebo reaktivními formami kyslíku uvolněných z neutrofilních granulocytů [60].



Významná je pro zánětlivý proces tím, že jako neaktivní proenzym je součástí sekundárních granul neutrofilů, které jsou prvními buňkami přítomnými v místě zánětu [60]. Důležitou vlastností je schopnost degradace extracelulární matrix (ECM) plodových obalů, především kolagenu typu I. Z toho vyplývá, že zvýšené hladiny MMP-8 v plodové vodě mohou souviset s porodem jak v termínu, tak i s porodem předčasným. Také bylo zjištěno, že jeho hladina koreluje s průběhem intraamniálního zánětu s hrozícím předčasným porodem [61].

### ***Katelicidin***

Při obraně proti mikroorganismům se jako jedna z prvních látek uplatňují antimikrobiální peptidy. Jedním z těchto peptidů jsou katelicidiny, u člověka je jako jediný známý katelicidim LL-37 (leucin-leucin-37). Jak už název napovídá, tento antimikrobiální peptid má výraznou antimikrobiální aktivitu, jak proti G-, tak i G+ bakteriím, houbám a virům. Peptid má schopnost narušovat membránu pomocí iontových vazeb. Snadno se dostává do vnitřního prostoru buňky, kde může iniciovat degradaci molekul důležitých pro viabilitu patogenu. Produkce probíhá ve fagocytech, NK buňkách, lymfocytech, ale i v keratinocytech, enterocytech a epiteliálních buňkách. K tvorbě dochází neustále, zvyšuje se v případě přítomnosti bakterií či jiných mikroorganismů a je ovlivněna mnoha faktory, například prozánětlivými cytokiny nebo růstovými faktory [62].

Katelicidin je exprimován i v epitelu děložního hrdla a brání vzestupu infekce v průběhu těhotenství. Jeho mikrobicidní účinky se uplatňují v plodové vodě. Jeho koncentrace se zvyšuje především v přítomnosti MIAC, ale i intraamniálního zánětu, u kterého může stimulovat tvorbu dalších biomarkerů zánětu. Zvýšená koncentrace se také nachází u spontánního porodu [63].

### ***Myeloperoxidáza***

Myeloperoxidáza (MPO) je enzym patřící do skupiny peroxidáz, jejichž součástí je komplexní sloučenina hem. Nejvíce je exprimována v neutrofilních granulocytech, ale v menším množství i v monocytech. Uložena je zde v primárních azurofilních granulích spolu s defenziny, hydrolázami a dalšími enzymy. K její syntéze dochází již při myelopoéze v promyelocytech a promonocytech. Stejně jako katelicidin se MPO váže na záporně nabitě struktury, kterými jsou povrchy patogenů, ECM a buněčné membrány. Tento enzym je důležitý pro oxidativní vzplanutí fagocytů tím, že z peroxidu vodíku a chloridu vytváří kyselinu chlornou, která má výrazné mikrobicidní účinky. Důležitá je také pro udržení buněčné homeostázy [64].

Zvýšená koncentrace MPO v plodové vodě je považována za biomarker aktivity a degranulace neutrofilních granulocytů. To znamená, že zvýšené hladiny jsou nacházeny u žen s přítomností MIAC a chorioamnionitidy bez ohledu na gestační věk. MPO je označována za jeden z pěti nejvíce dysregulovaných biomarkerů plodové vody, protože vykazuje různé hladiny při PPRM. To potvrzuje, že aktivace neutrofilů má důležitou roli při zánětlivých procesech u těhotných žen [65].

### ***Interleukin 8***

Interleukin 8 (IL-8) je chemokin stimulující neutrofilny, monocyty a makrofágy a podporující jejich migraci do místa zánětu. Předpokládá se autokrinní působení u monocytů a makrofágů. Dále může být tvořen i lymfocyty, fibroblasty, buňkami hladké svaloviny nebo endotelovými buňkami. Důležité jsou IL-8 chemokinové receptory CXCR1 a CXCR2 patřící do receptorů spřažených s G proteinem. Tyto receptory spolupracují na přenosu signálu intracelulárně pomocí fosfolipázy C a inositol trifosfátových sekundárních posílů, což následně způsobí zvýšení hladiny intracelulárního vápníku související s dalším přenosem signálu. Tyto receptory se nacházejí především na povrchu makrofágů [66].

IL-8 může být dalším vhodným biomarkerem pro intraamniální zánět a infekci. Bylo zjištěno, že tento biomarker je vhodným ukazatelem chorioamnionitidy před porodem. Důležité je, že množství IL-8 v plodové vodě koreluje se stádiem tohoto zánětu. Hodnotit lze stadia I-III, kdy se ve třetím stádiu dle množství IL-8 zvažuje ukončení těhotenství vzhledem ke gestačnímu stáří. K ukončení těhotenství je však přistoupeno až na základě stanovení většího počtu se zánětem spjatých biomarkerů [67].

### ***Neutrofilní lipokalin***

Tento protein, označován jako NGAL, je jedním z členů rodiny lipokalinů, který je produkován imunitními buňkami, ale i buňkami ledvinných tubulů a hepatocyty, a to jako reakce na patologický proces. Má bakteriostatické účinky, je schopen zachycovat molekuly vázající železo a také je důležitou složkou vrozené imunity vůči bakteriálním infekcím. Ligandem pro NGAL je tzv. enterochelin (či jeho degradační produkt), který může být produkován některými specifickými bakteriemi. NGAL touto vazbou zabraňuje růstu bakterií, které potřebují enterochelin pro správné množství železa. Mimo imunitní systém může sloužit jako časný biomarker selhání ledvin [68]. Na základě jeho funkce vázat železo a reagovat na prozánětlivé signály je někdy označován za protein akutní fáze [69].

Vajrychová, a kol. [69] popsali, že zvýšená hladina NGAL v plodové vodě je spojena s přítomností MIAC, který vede ke vzniku chorioamnionitidy. V odborné literatuře se lze dočíst i o NGAL ve spojení s intraamniálním zánětem vedoucím k PPRM. Přesto je ale stále za nejlepší biomarker s prediktivní hodnotou pro intraamniální zánět a PPRM považován sTLR2. Intenzita intraamniální zánětlivé reakce je rozdílná dle gestačního věku, to znamená, že hranici tvoří přibližně 32. týden a týdny nad a pod se liší v této zánětlivé odpovědi. Z tohoto důvodu je složité najít pro tento stav vhodný univerzální biomarker [69].

### ***Sérový amyloid P***

Sérový amyloid P (SAP) je dalším členem pentraxinové rodiny, který je tvořen především játry a na rozdíl od CRP není u člověka považován za protein akutní fáze [50]. V rámci imunitního systému se podílí na rozvoji humorální části vrozené imunity [70]. Tento protein interaguje jak s mikroorganismy, tak i s tkáňovými zbytky za účelem usnadnění jejich fagocytózy [50]. Obsahuje dvě vápník vázající oblasti, díky čemuž je schopný vázat se na DNA, laminin, fibronectin, kolagen typu IV a některé další látky, jako na neutrofilní granulocyty. Touto vazbou na neutrofile snižuje jejich navázání na složky ECM a také snižuje jejich adhezi k endoteliálním buňkám [71]. Při saturaci vápníkem je SAP velmi odolný vůči jakémukoli proteolytickému štěpení. Pokud ale vápník není přítomen, je náchylný k proteolytickému štěpení právě v místě, kde by se vápník měl vázat [70].

Koncentrace SAP v plodové vodě je asi tisíckrát nižší než v séru. Vyšší koncentrace v plodové vodě se objevují u žen s intraamniálním zánětem, naopak k jeho zvýšení nedochází, jako u jiných pentraxinů, v přítomnosti MIAC [50].

### ***CD163***

CD163 je glykosylovaný membránový protein nacházející se především na povrchu monocytů a makrofágů. Jedná se o tzv. scavenger receptor bohatý na cystein, který je schopný vylučovat komplexy hemoglobinu s haptoglobinem. Jeho stimulace probíhá na základě přítomnosti IL-6, IL-10 a glukokortikoidů, naopak bývá inhibován (suprimován) TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ . CD163 se vyskytuje především na tzv. alternativně aktivovaných makrofázích, které se uplatňují při hojení, angiogenezi, ale i při metastazování nádorů [72].

Jeho rozpustná forma sCD163, nacházející se v tělesných tekutinách, se uplatňuje jako biomarker aktivace makrofágů u různých onemocnění [72]. sCD163 bývá označován především za biomarker předčasného porodu [21]. Kacerovský, a kol. [73] udává, že sCD163 může být i biomarkerem chorioamnionitidy a funisitidy.

## 1.6 Intraamniální zánět

Intraamniální zánět vzniká především ze dvou hlavních příčin. Buď se na vzniku zánětlivého procesu podílejí mikroorganismy s následně vzniklou infekcí, nebo se naopak může objevit zánět i bez přítomnosti jakékoli infekce z jiných různých příčin. Odlišit od sebe tyto dva stavy není vůbec jednoduché. Mohou nastat i situace, kdy žena s infekčním intraamniálním zánětem může mít falešně negativní kultivaci a naopak.

### 1.6.1 Infekční intraamniální zánět

Infekční zánět je zánětlivý proces, který vzniká na podkladě přítomnosti mikroorganismů v intraamniální dutině. Tento stav se označuje jako mikrobiální invaze do intraamniální dutiny (MIAC). Intrauterinní prostor je sterilním místem a za normálních okolností mikroorganismy nejsou přítomny. Do děložní dutiny se dostávají nejčastěji vzestupem z urogenitálního traktu matky [74]. Mezi nejčastější patogeny patří bakterie *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus agalactiae* či *Gardnerella vaginalis*. Objevit se mohou ale i viry, nejčastějšími jsou cytomegalovirus, adenovirus nebo enterovirus [1].

Při vzniku intraamniálního zánětu dochází k produkci prozánětlivých cytokinů (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) a k infiltraci neutrofilů do plodových obalů, placenty i plodové vody. Na základě působení patogenů a prozánětlivých cytokinů se zvyšuje riziko předčasného porodu a PPRM. Tito novorozenci mohou být ohroženi nekrotizující enterokolitidou, sepsí či bronchopulmonální dysplázií [74].

Hlavním ukazatelem infekce v intraamniálním prostoru je hladina glukózy v plodové vodě, množství leukocytů, přítomnost bakterií, přítomny mohou být ale i další známky zánětlivého procesu. Při podezření na MIAC se provádí kultivace plodové vody a PCR. Kultivace plodové vody ale není moc specifická, protože se zde mohou objevovat i obtížně kultivovatelné mikroorganismy. Z těchto důvodů se používá technika PCR, kterou se v plodové vodě prokazuje 16S prokaryotická podjednotka ribozomální RNA specifická pro každý patogen. Objevit se může i situace, kdy kultivace mikroorganismů je pozitivní, ale PCR je negativní. Nižší citlivost PCR se může objevit při velice malém množství bakterií nebo v přítomnosti inhibitorů PCR v tělesných tekutinách [26].

## 1.6.2 Neinfekční zánět

Intraamniální zánět může vzniknout i bez přítomnosti mikroorganismů v děložní dutině. Hovoříme o tzv. sterilním intraamniálním zánětu, který vzniká na podkladě jiných mechanismů, kterými může být buněčný stres, nekróza [75] nebo hypoxie plodu [76]. Tyto stavy vyvolávají migraci leukocytů a uvolnění prozánětlivých mediátorů, které jsou schopny aktivovat složky vrozené imunity. Tyto mediátory se fyziologicky uvolňují při porodu v termínu a jejich dřívější uvolnění ohrožuje matku i plod, a to především narušením funkce placenty, porušením dělohy a poruchou tolerance mezi matkou a plodem, případně i krvácením [76].

Mezi hlavní alarminy uvolňující se během sterilního intraamniálního zánětu patří především IL-1, kyselina močová, amfoterin (HMHB1) a fetální DNA cirkulující v mateřské krvi [75]. Nejedná se ale o specifické ukazatele sterilního intraamniálního zánětu, objevují se i u opakovaných potratů, preeklampsie nebo předčasného porodu [76].

Tento druh zánětu je u gravidních žen častější než MIAC. Stejně jako u infekčního zánětu se v plodové vodě nachází biomarkery zánětu, ale kultivace i PCR je negativní [76]. Diagnostikovat tento stav je velice obtížné, protože ne vždy mohou být mikroorganismy detekovatelné a získáváme pak falešně negativní výsledky. Udává se, že u pacientek se sterilním intraamniálním zánětem jsou zjišťovány nižší hladiny IL-6, než u pacientek s MIAC [75].

Cílem budoucích výzkumů neinfekčního intraamniálního zánětu je účinné blokování alarminů, které bylo úspěšné u jiných zánětlivých onemocnění. Při výzkumech ohledně neinfekčního intraamniálního zánětu se používají zvířecí modely, u kterých je nutný vývoj preeklampsie a dalších patologií, které by korelovaly s patologickými stavy těhotných žen, což je nesnadný úkol [76].

## 1.7 Metody pro průkaz biomarkerů zánětu v plodové vodě

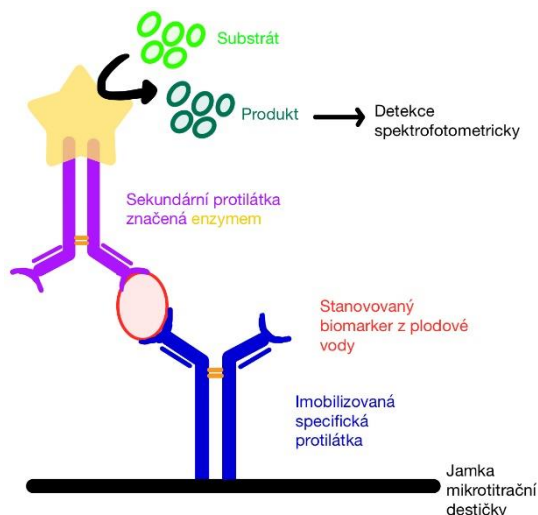
Pro potvrzení či vyvrácení přítomnosti zánětu, tj. specifických biomarkerů zánětu v plodové vodě, je nutné využít velice citlivé metody pro průkaz biomarkerů zánětu, a to i v minimálních koncentracích, řádově mikro-, nano- až pikogramů stanovované látky. Jedná se nejčastěji o imunoanalytické metody založené na specifické reakci antigen-protilátka. Dnešní plně automatizované metody využívají toho, že je jedna z reagujících složek imunokomplexu vázaná na pevnou fázi (např. na stěnu mikrotitrační jamky, na povrch magnetické částice). Tyto povrchy pak slouží k zachycení stanovovaného analytu. Pro průkaz a kvantifikaci nově vytvořeného imunokomplexu se používají tzv. sekundární protilátky s indikátorem. IgG molekuly s kovalentně vázaným indikátorem typu enzymu, kvantové tečky nebo částice zlata se označují termínem konjugát. Indikátory poskytují měřitelný signál, který je úměrný množství analytu ve vzorku. Volba indikátoru je vždy odvislá od očekávané koncentrace analytu ve vyšetřovaném vzorku. Elektrochemiluminiscenční značka, dnes běžně používaná v automatických analyzátoch typu ECLIA, poskytuje amplifikovaný signál dostatečně citlivý pro průkaz analytů v piko- až femtomolovém množství.

### 1.7.1 Enzymová imunoanalýza (ELISA)

Jednou z nejdůležitějších rutinně používaných metod pro stanovení biomarkerů proteinové povahy je metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Používají se komerční mikrotitrační destičky, které mají v jednotlivých jamkách imobilizované specifické protilátky proti stanovovanému biomarkeru. Materiálem vhodným pro detekci je kapalný biologický materiál, především sérum, plazma, likvor, synoviální tekutina nebo plodová voda. Pokud je biomarker zánětu – tzv. antigen – v plodové vodě přítomen, naváže se na vázanou specifickou protilátku. Signál úměrný vzniklému množství imunokomplexů poskytuje tzv. biokonjugát, který se váže na antigen a vytváří tzv. „sandwich“ (obrázek 6). ELISA metoda využívá pro detekci enzymy, nejčastěji křenovou peroxidázu nebo alkalickou fosfatázu. Tyto enzymy jsou schopny přeměny substrátu na produkt, čímž vzniká specifické zabarvení roztoku, které je následně měřeno spektrofotometricky. Koncentrace stanovovaného biomarkeru se odečítá z ředící řady standardů o známé koncentraci.

Mezi hlavní látky poskytující barevnou změnu patří TMB (tetramethylbenzidine) nebo OPD (*o*-phenylenediamine dihydrochloride). TMB je považován za citlivou chromogenní látku, v oxidovaném stavu vzniká modře zbarvený roztok. Po přidání zastavovacího roztoku (kyselina sírová) mění svou barvu na žlutý produkt. Absorpční maximum TMD je

370 nm a 652 nm, po proběhnutí reakce přidáním zastavovacího roztoku a změně barvy je absorpční maximum 450 nm. OPD poskytuje se změnou oxidačního stavu žlutooranžové zbarvení s absorpčním maximem 492 nm [77].



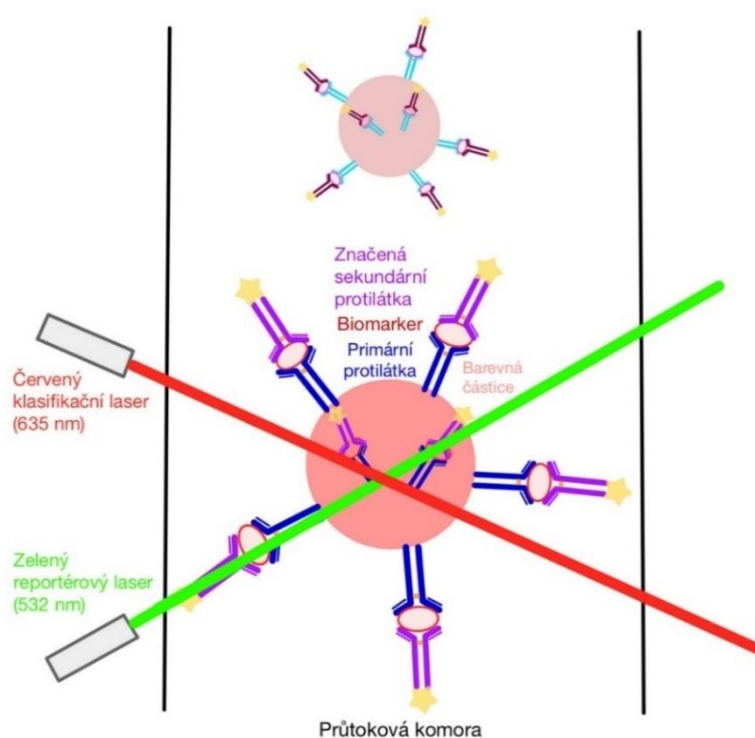
**Obrázek 6:** Schéma ELISA metody v sendvičovém uspořádání pro průkaz antigenu (zdroj: vlastní)

### 1.7.2 Multi-Analyte Profiling Technology (xMAP)

Další nově, ale v některých laboratořích již rutinně využívanou metodou je metoda xMAP (Multi-Analyte Profiling Technology). Jedná se o multiplexovou analýzu, při které je možné stanovení více biomarkerů zároveň. Zahrnuje 100 sad barevných částic, které jsou barveny dvěma fluorescenčními barvami v různých poměrech, což právě umožňuje detekci více analytů z jednoho vzorku současně. Na jejich povrchu jsou imobilizované specifické protilátky proti stanovovaným biomarkerům. Tyto obarvené částice s imobilizovanými protilátkami jsou inkubovány se vzorkem, v našem případě s plodovou vodou. K identifikaci a kvantifikaci sledovaných biomarkerů se stejně jako u metody ELISA do reakce přidávají sekundární protilátky, které jsou značeny indikátorem, např. fluorescenční barvou fykoerytrinem [78].

Průkaz imunokomplexů v tomto případě využívá principu průtokové cytometrie – tzn., že částice jsou řazeny za sebou v kapiláře v protékajícím nosném proudu jako korálky na niti. Každá částice prochází 2 laserovými paprsky – červeným klasifikačním ( $\lambda = 635$  nm) a zeleným reportérovým ( $\lambda = 532$  nm), (obrázek 7). Červený laser excituje barviva každé částice a identifikuje její spektrum, zelený laser excituje značku spojenou s částicí (fykoerytrin), čímž umožňuje kvantifikaci analytu s použitím ředící řady standardů o známé

koncentraci. Vysokorychlostní procesory a speciální software zpracovávají fluorescenční signál pro každou částici a následně tento signál převádí na číselně vyjádřitelnou veličinu [78].



**Obrázek 7:** Schéma xMAP metod pro multiplexní průkaz více analytů při jedné analýze (zdroj: vlastní)

### 1.7.3 Imunochemické senzory kategorie POCT

Další možností, jak stanovit přítomnost biomarkerů zánětu nebo nádorových onemocnění v tělních tekutinách je pomocí imunochemického senzoru. Způsoby detekce se mohou lišit, a to v závislosti na výběru indikátoru, značky konjugované se sekundární protilátkou. Snahou je vývoj tzv. POCT přístrojů (Point-of-Care-Testing), které lze použít u lůžka pacienta, bez požadavku na odborný personál a vybavenou laboratoř. Jedná se o miniaturizované imunochemické biosenzory, díky kterým lze vyšetřovat tělesné tekutiny pacienta přímo u jeho lůžka nebo v ordinaci lékaře. Tato analýza může zahrnovat různé typy látek. V současnosti je výzkum biosenzorů zaměřen na multiplexové stanovení více analytů v jedné analýze. Hlavními kritérii biosenzorů je rychlost, cena a použití v terénu na úkor vyšší chybovosti a kvalitativní až semikvantitativní analýze. Přesnou koncentraci analytu tímto typem testů nelze validně stanovit.

Senzory mohou využívat mnoha principů detekce v závislosti na jejich použití. Jejich hlavním úkolem je převod informace ze stripu či elektrody s analyzovanou látkou na



měřitelný signál, který je úměrný množství analytu ve stanovovaném vzorku. Na tomto principu je založen i nejpoužívanější POCT senzor – glukometr. Jedná se o nejjednodušší kvantitativní senzor, pomocí kterého je převáděna enzymatická oxidace glukózy glukózaoxidázou na číselnou hodnotu [79]. POCT senzory se uplatňují i v analýze různých proteinů, výhodné je jejich použití i pro detekci přímo mikroorganismů způsobujících onemocnění, pro stanovení nukleových kyselin nebo metabolitů [80].

Důležitým faktorem pro POCT přístroje je použití malých objemů stanovovaných vzorků, od nl až po jeden ml s citlivostí v řádech femtomolárních až milimolárních koncentrací [80]. S minimalizováním množství potřebného vzorku souvisí i minimalizace velikosti přístrojů a cena. Výhodou je nenáročnost senzorů na čas analýzy, kdy je ušetřen čas nejen při transportu vzorku, ale i při vydávání výsledků [79]. Na druhou stranu jsou tyto senzory specializované pouze na jeden typ stanovovaného analytu. Vzorky nejsou dávkovány přímo do senzoru, ale používají se jednorázové systémy stripů, čipů či elektrod dle použité metody [80].

Elektroaktivní indikátory bývají často v komplexu se sekundárními detekčními protilátkami a umožňují tvorbu elektrochemických signálů na základě jejich redoxních vlastností v kyselém prostředí. Mezi elektroaktivní značky se mohou řadit kvantové tečky či kovové nanočástice zahrnující částice stříbra nebo zlata [81].

### **1.7.3.1 Senzory na bázi magnetických částic**

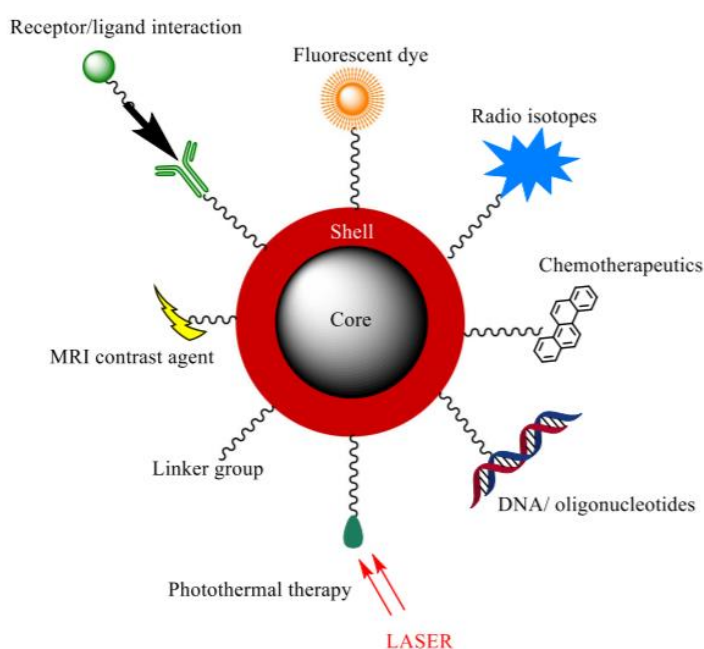
V dnešní době se pro některé imunosenzory používají i metody, které využívají výhod superparamagnetických mikročástic, často v kombinaci s elektrochemickou detekcí [81]. Pomocí magnetických částic s imobilizovanými specifickými protilátkami je možné odseparovat stanovovaný analyt z komplexní matrice biologického materiálu. S použitím vhodného indikátoru lze analyt označit a elektrochemickou detekcí analyt kvantifikovat. Pro imunosenzory s elektrochemickou detekcí se využívají jednorázové tištěné elektrody, které jsou schopny zachytit pohyb elektronů elektroaktivní značky produkovaných během redoxní reakce a převést je na měřitelnou hodnotu.

Magnetická separace je účinná separační metoda využívající k izolaci látek magnetické částice o velikosti několika nanometrů. Na tyto částice je možné navázat určitý ligand (enzym, protilátku atd.) zachytávající požadovaný analyt. Díky magnetismu a využití magnetického stojánku je možné lehce odseparovat zbylé nenavázané látky. Existují dva přístupy: pozitivní a negativní selekce. V případě pozitivní selekce dochází k izolaci analytu na

magnetické částice a k odstranění zbylých látek v roztoku. Naopak negativní selekce znamená odstranění všech nežádoucích látek ze vzorku navázáním na magnetické částice, požadovaný analyt zůstává izolovaný ve zbylém roztoku.

Magnetické částice jsou sférické částice, které jsou tvořeny především kovy (železo, nikl, kobalt) a jejich oxidy, pro medicínské účely se používají nejčastěji částice oxidů železa, především maghemit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) a magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) [82]. Na povrchu částic se nachází polymerní obal chránící oxid kovu před vnějším prostředím a který poskytne funkční skupiny pro další modifikaci povrchu, v našem případě pro připojení specifických protilátek. Jedná se o aminové, karboxylové, hydroxylové či epoxidové funkční skupiny. Povrch může být modifikován i různými proteiny, například proteinem A [83].

Tyto superparamagnetické částice vykazují po vystavení magnetickému poli magnetické vlastnosti a v okamžiku vychýlení z tohoto pole již nevykazují zbytkový magnetismus. Hlavní výhodou oproti ostatním materiálům je nejen snadná separace, ale i chemická a tepelná stabilita [82]. V medicíně se částice s těmito vlastnostmi využívají pro různé typy aplikací (obrázek 8) [84].



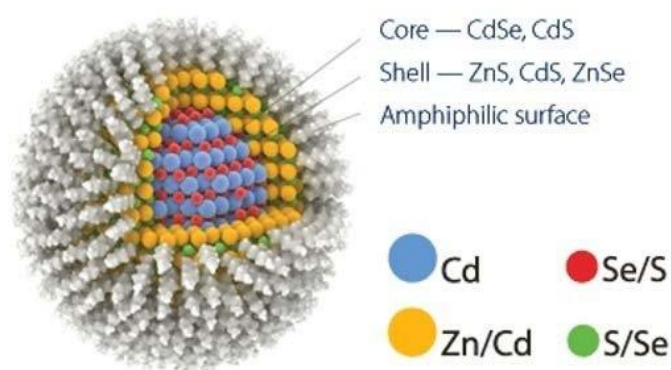
**Obrázek 8:** Využití magnetických částic v *in vivo* a *in vitro* diagnostice (převzato z: [84])

Protilátky mohou být na magnetické částice imobilizovány kovalentními i nekovalentními interakcemi. Kovalentní vazba je výhodnější pro správnou orientaci protilátek na magnetickou částici a zvyšuje tím i její stabilitu. Aby bylo možné specifické protilátky

imobilizovat, musí dojít nejdříve k jejich modifikaci. Tímto procesem dochází k odhalení specifických funkčních skupin, které mohou následně reagovat s funkčními skupinami na magnetických částicích. Lze použít i proces tzv. biotinylace protilátek, kdy se takto modifikované protilátky vážou na streptavidinem pokryté magnetické částice. Imobilizace protilátek je možná i pomocí vazebných proteinů, jako je například protein A nebo G, které reagují specificky přímo s Fc fragmentem protilátky, díky čemuž dochází k uspořádanému navázání protilátek na magnetické částice [85].

### 1.7.3.2 Senzory s elektrochemickou detekcí na bázi kvantových teček

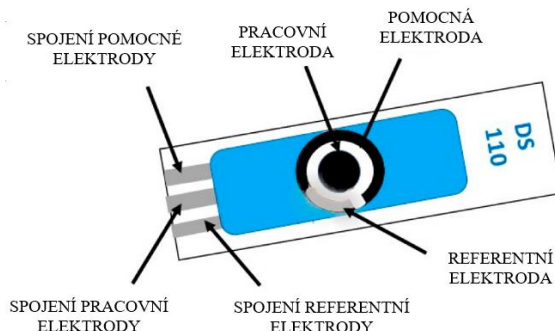
Kvantové tečky neboli Quantum Dots (QD) jsou polovodičové nanočástice o velikosti do desítek nanometrů skládající se z krystalického polovodičového jádra tvořeného slitinami kovů a z obalu tvořeného anorganickými látkami zvyšujícími stabilitu částic. Nejčastěji jsou tvořeny sloučeninami CdS, CdSe, ZnS nebo ZnSe (obrázek 9) [86]. Jejich hlavní vlastností je schopnost fluorescence s velkým Stokesovým posunem a vlnová délka emitovaného záření je závislá na typu použitého materiálu částice a jejím průměru [87]. V elektrochemii se využívá detekce těchto kovů QD pomocí square wave anodické rozpouštěcí voltametrie (SWASV). QD mohou být využity i pro tvorbu biokonjugátu se sekundárními protilátkami pro detekci a kvantifikaci biomarkerů z plodové vody. Použít se mohou QD Zn, Cd a Pb, místo kterého lze použít i zlaté nanočástice. Výhodou použití těchto QD je jejich různá odezva, tzn. že získané píky se nepřekrývají.



**Obrázek 9:** Struktura kvantové tečky (převzato z: [86])

Pro elektrochemickou detekci obecně je stěžejní použití elektrod. V současnosti je populární využití tištěných elektrod na jedno použití (obrázek 10). Principem tištěných elektrod je tzv. sítotisk, proto se označují jako sítotiskové elektrody (SPE). Základním

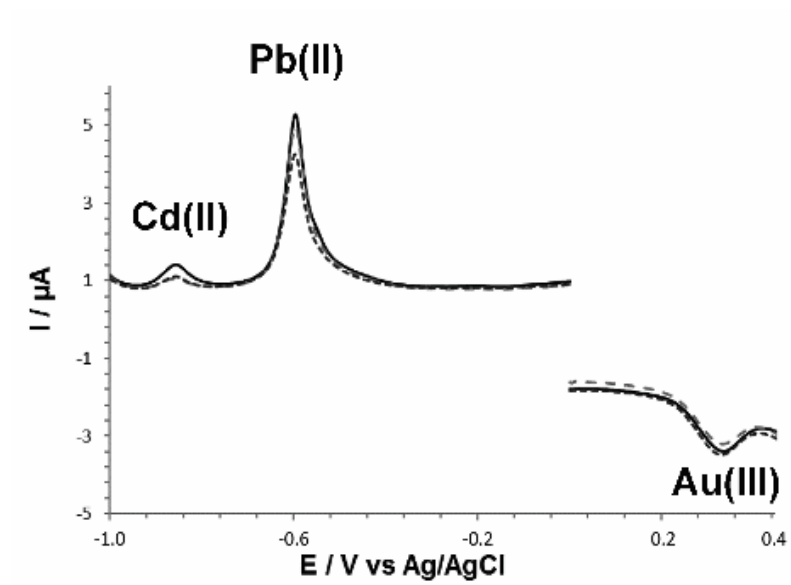
materiálem pro výrobu SPE je plastový podklad, na který je pomocí inkoustového tisku nanášena nejen pracovní, ale i referenční a pomocná elektroda [88]. Vlastnosti pracovní elektrody závisí na použitém inkoustu, nejčastěji se používá zlato, uhlík či jiné kovy [89]. Pro její požadované vlastnosti lze do inkoustu přidat látky, kterými mohou být enzymy, kovy či různé nanomateriály. Výhodné je použití těchto elektrod pro POCT metody sloužící k rychlé detekci analytu nebo jako screening. Jsou poměrně levné, jednorázové, nevýhodou je ale naopak nízká robustnost [88].



**Obrázek 10:** Tisťená elektroda SPE pro elektrochemickou detekci (převzato z: [89], upraveno)

Pro elektrochemickou detekci je specifické převedení chemických vlastností pacientského či analyzovaného vzorku na elektrické veličiny. K elektrochemické detekci je nutná přítomnost elektrod, které zajišťují tento převod vlastností na signál. Na pracovní elektrodu je vložen určitý potenciál a dochází zde k výměně elektronů mezi analyzovaným vzorkem a elektrodou, čímž dochází ke změně proudu (např. u kvantových teček Cd dochází k redukci Cu(II) na Cu(I)) [88].

Při použití magnetických částic s imobilizovanými specifickými monoklonálními protilátkami zachycujícími požadovaný biomarker následně označeného pomocí biokonjugátu tvořeného sekundárními protilátkami s QD je nutné, aby před elektrochemickou detekcí proběhla kyselá hydrolýza kyselinou chlorovodíkovou (HCl). Až tento systém obsahující volné kovy může být elektrochemicky detekován anodickou rozpouštěcí „square wave“ voltametrií, kdy se na elektrodu vkládá lineárně se měnící potenciál. Jelikož jsou QD vázány na sekundární specifické protilátky, odpovídá jejich signál množství analytu ve vzorku. Po elektrochemickém proměření se získá spektrum píků specifických pro dané QD (obrázek 11) [90].



**Obrázek 11:** Výsledek elektrochemické detekce kvantových teček (převzato z: [90])

## 2 CÍL PRÁCE

Úkolem diplomové práce bylo pro projekt PersonMed připravit vhodný imunosorbent na bázi magnetických částic, který díky kovalentně vázaným monoklonálním protilátkám specificky vychytává antigen PTX3 z komplexního biologického materiálu, tedy z plodové vody. Tento imunosorbent byl součástí nově vyvíjeného imunosenzoru založeného na imunomagnetické separaci s elektrochemickým průkazem antigenu. Senzor by v budoucnu měl sloužit k simultánnímu stanovování tří biomarkerů zánětu v plodové vodě během jedné analýzy pro průkaz intraamniálního zánětu u těhotných žen. Při stanovování pouze jednoho analytu je riziko vzniku falešně pozitivních či falešně negativních výsledků.

Dílčí kroky práce:

1. Ověření reaktivity specifických protilátek (vyrobených hybridomovou technikou) s antigenem technikou western-blot s následnou imunochemickou detekcí
2. Kovalentní vazba specifických IgG protilátek na povrch magnetických částic pomocí: COOH skupiny, hydrazidové skupiny, proteinu A
3. Ověření účinnosti vazby protilátek na magnetické částice pomocí SDS-PAGE
4. Příprava vlastního imunosorbentu pro specifickou izolaci pentraxinu 3 – modelový vzorek s rekombinantním antigenem, vzorek plodové vody
5. Ověření funkčnosti imunomagnetické separace ve spojení s elektrochemickou detekcí technikou SWASV

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Biologický materiál

Hlavním biologickým materiálem byla plodová voda odebraná gravidním ženám s intraamniálním zánětem a kontrolní plodová voda zdravých gravidních žen. Vzorky byly odebírány po informovaném souhlasu pacientkám hospitalizovaným na Gynekologickém oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové a poskytnuty prof. MUDr. Marianem Kacerovským, Ph.D. pro tento výzkum.

#### Protilátky a antigeny

- Modelové antigeny a protilátky:  $\alpha$ -chymotrypsin z hovězího pankreatu, ovalbumin – albumin z vaječných bílků (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- IgG z lidského séra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hyperimunní prasečí sérum s anti-chymotrypsinovými protilátkami vyrobeno imunizací prasete chymotrypsinem
- Polyklonální protilátky IgG proti PTX3 (Sino Biological, Peking, Čína)
- Monoklonální protilátky proti PTX3 – klony 6D9, 1.1 a 7.1 vyrobeny hybridomovou technikou po imunizaci myši PTX3 (Moravian Biotechnology, Brno, Česká republika)
- Lidský pentraxin 3 – Human Pentraxin 3 (PTX3) (Abbexa, Cambridge, Velká Británie)
- Sekundární polyklonální anti-myší protilátky IgG značené peroxidázou pro použití v metodě dot-blot (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 3.2 Přístroje

- Mini-PROTEAN Tetra Cell aparatura pro vertikální gelovou elektroforézu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- PowerPac™ Basic Power Supply zdroj napětí pro elektroforézu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Orion 420 pH metr (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- MiniSpin centrifuga (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Vortex (Grant-bio, Cambridge, Velká Británie)
- Termoblok (Grant-bio, Cambridge, Velká Británie)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, Göttingen, Německo)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn, Balingen, Německo)

- Třepačka PSU-20i (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Rotátor RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Vakuový koncentrátor pro dot-blot (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
- Miniodstředivka (Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- ChemiDoc™ XRS+ System stanice se softwarem ImageLab pro hodnocení gelů
- Dot-blot DHM 96 unit (Scie-Plas, Cambridge, UK)
- Potenciostat PalmSens2 spojený se software PStTrace (Palm Instrument, Eindhoven, Nizozemí)

### 3.3 Pomůcky a materiál

- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Magnetický separátor DynaMag™-2 Magnet (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- AMICON Ultra-0,5 mL 100K odsolovací kolonky (Merck Millipore, Massachusetts, USA)
- Protein LoBind Tube 1,5 mL; 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- PVDF membrány Immun-Blot™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Mini-PROTEAN® podložní skla 0,75 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Mini-PROTEAN® krycí skla Short Plates (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Plastová kolona Bio-Spin objem 1,2 ml (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Affi-Gel Protein A Gel pro tvorbu nosiče v koloně (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Tištěné elektrody s bizmutovým filmem BiSPCE (DropSens, Spain)

### 3.4 Chemikálie

- Akrylamid (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- N,N-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- TRIS: Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- SDS: Dodecylsulfát sodný (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Persíran amonný (Lachema a.s., Brno, Česká republika)
- TEMED: N, N, N, N-tetramethylenethyldiamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina citrónová (Fluka, Buchs, Švýcarsko)



- Formaldehyd 38% (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- AgNO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- NaOH (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Vodný roztok amoniaku (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- MES: 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- NaCl (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- KCl (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina octová (Penta, Chrudim, Česká republika)
- HCl 36% (Penta, Chrudim, Česká republika)
- EDTA: Ethylendiamintetraoctová kyselina (Lachema a.s., Brno, Česká republika)
- Borátová kyselina (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- EDAC: N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- S-NHS: N-hydroxysulfosukcinimid sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DTT: Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- IAA: Indolyl-3-octová kyselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Močovina (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- NaIO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- DL-glyceraldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenglykol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Comassie Blue barvicí roztok na gely – Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Ethanol 96% (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Molekulový standard pro SDS-PAGE – Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Substrátový roztok pro dot-blot Opti-4CN™ Substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

- CdTe core-type kvantové tečky funkcionalizované COOH s fluorescencí při 570 nm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Silika nanočástice s NH<sub>2</sub> funkční skupinou (Orion High Technologies, Madrid, Španělsko)
- Precision Plus Protein Standards – All Blue Standards, 10 proteinů o molekulové hmotnosti 10-250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

### **3.5 Magneticky aktivní mikročástice**

- Magnetické částice s proteinem A – PureProteome Protein A Magnetic Beads, velikost částic 10 μm (Millipore Corp., Massachusetts, USA)
- Magnetické částice s COOH skupinou – Dynabeads™ MyOne™ Carboxylic Acid, průměr částic 1,05 μm, (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Magnetické částice s COOH skupinou – SIMAG-COOH, velikost částic 1 μm (Chemical Cell, Berlín, Německo)
- Magnetické částice s hydrazidovou skupinou – SIMAG-Hydrazide, velikost částic 1 μm (Chemical Cell, Berlín, Německo)

### 3.6 Příprava roztoků

#### 3.6.1 Pufry

Zde je uveden přehled všech pufrů používaných v této práci:

*Tabulka 5: Přehled použitých pufrů*

Pufr	Kyselina	Zásada	pH	Přidané látky
Fosfátový	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	7,0; 7,2; 7,3; 8,0	varianta s NaCl
PBS pufr	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	7,4	NaCl, KCl, Tween 20
MES pufr	MES	NaOH	5,0	-
Glycinový	HCl	glycin	2,8	varianta s NaCl
TRIS-HCL	HCl	Tris	9,5	-
Acetátový	kyselina octová	octan sodný	4,6	varianta s NaCl
TBE	kyselina boritá	Tris	8,3	EDTA
Kyselina citrónová	kyselina citrónová	citronan sodný	3,0	-

#### 3.6.2 Roztoky pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu

##### Roztoky pro tvorbu gelů

*Roztok A:* 11,68 g akrylamidu s 0,32 g bisakrylamidu rozpuštěno ve 12 ml destilované vody, ponecháno na třepačce do úplného rozpuštění přibližně 30 minut. Doplněno destilovanou vodou na 40 ml.

*Roztok B:* 7,26 g Tris do 40 ml destilované vody. Úprava pH 6M HCl pro získání pH 8,8.

*Roztok C:* 4,84 g Tris do 40 ml destilované vody. Úprava pH 6M HCl pro získání pH 6,8.

*Roztok D:* 1 g SDS na 10 ml destilované vody.

*Roztok E:* 0,1 g persíranu amonného na 1 ml destilované vody.

### **Roztoky pro vlastní analýzu SDS-PAGE**

*Elektrodový pufr:* 1 g SDS, 3,03 g Tris, 14,4 g glycinu rozpuštěno v 1 l destilované vody. Z důvodu větší spotřeby tvořen 10x koncentrovaný elektrodový pufr

*Roztok G:* 100 mM Tris-HCl pufr pH 6,8, 4% SDS, 20% glycerol a 0,2% bromfenolová modř

*Roztok F:* 100 mM Tris-HCl pufr pH 6,8, 4% SDS, 200 mM merkaptoethanol, 20% glycerol a 0,2% bromfenolová modř

*Molekulový standard:* Komerční Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards, 10 proteinů o molekulové hmotnosti 10-250 kDa

### **3.6.3 Barvení gelů**

*Fixační roztok:* 50 ml ledové kyseliny octové s 500 ml ethanolu doplněno na 1 l destilovanou vodou.

*10% roztok glutaraldehydu:* 20 ml 50% roztoku glutaraldehydu doplněno na 100 ml destilovanou vodou.

*Roztok amoniakálního stříbra:* k 21 ml destilované vody s 1,4 ml vodného roztoku amoniaku a s 239  $\mu$ l 9M hydroxidu sodného je přidáván 20% dusičnan stříbrný do vzniku hnědého zákalu, doplněno na 100 ml destilovanou vodou.

*Vyvolávací roztok:* 250 mg kyseliny citrónové s 540  $\mu$ l 38% formaldehydu doplněno do 500 ml destilovanou vodou.

*Ustalovací roztok:* 50 ml ledové kyseliny octové doplněno destilovanou vodou na 1000 ml.

## 3.7 Metody

### 3.7.1 Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

#### Příprava polyakrylamidových gelů

*Roztoky:* Roztoky A, B, C, D, E, TEMED, destilovaná voda

*Pomůcky:* Aparatura pro přípravu gelů Mini-PROTEAN Tetra Cell, 0,75 mm skla na gely, krycí skla, parafilm, automatické pipety, špičky, mikrozkušavky, filtrační papír

*Postup:*

- o Mezi skla upevněná ve stojánku byly pipetovány roztoky dle požadované porozity gelu (10% nebo 12%), dělicí gel byl vždy převrstven gelem zaostřovacím, tabulka 6:

*Tabulka 6: Pipetované objemy pro přípravu polyakrylamidových gelů*

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

- o Roztok E musí být dávkován vždy jako poslední, protože iniciuje vlastní polymeraci. Polymerace gelu trvá přibližně 30 minut.
- o Gel se převrství obsahem zkumavky se zaostřovacím gelem a mezi skla se vloží šablona s 10 jamkami pro aplikaci vzorků. Polymerace gelu trvá přibližně 15 minut.

#### Příprava vzorků k analýze

*Roztoky:* Elektrodový pufr, roztok G nebo F, směsný standard Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards, stanovované vzorky

*Pomůcky:* Aparatura pro SDS-PAGE Mini-PROTEAM Tetra Cel, zdroj napětí PowerPac™ Basic Power Supply, termoblok, miniodstředivka, připravené gely

*Postup:*

- Z každého vzorku se odpipetuje 10  $\mu$ l a smíchá s roztokem G (F). Promíchá se, odstředí a 3 minuty se provaří v termobloku.
- Do každé jamky je pipetováno 10  $\mu$ l provařeného vzorku, molekulový standard je pipetován v objemu 3  $\mu$ l.
- Sestaví se aparatura, na zdroji napětí se nastaví konstantní napětí na hodnotu 180 V na všechny gely a 30 mA na jeden gel.
- Vlastní elektroforéza probíhá přibližně 50 minut a průběh lze kontrolovat pomocí bromfenolové modři přítomné v roztoku G (F).
- Po ukončení analýzy se gely ze skel převedou pomocí destilované vody do Petriho misek.

**Barvení gelů Coomassie Brilliant blue**

*Roztoky:* Fixační roztok, komerční roztok Bio-Safe™ Coomassie Stain, destilovaná voda

*Postup:*

- Před samotným barvením se gel propláchně 3x destilovanou vodou a následně převede do fixačního roztoku na alespoň 30 minut na třepačce, nebo se inkubuje přes noc při 4 °C.
- Gel se 30 minut rehydratuje destilovanou vodou, následně se přidává barvicí roztok, se kterým se inkubuje alespoň 1 hodinu na třepačce.
- Gel se odbarvuje odbarvovacím roztokem, nebo destilovanou vodou až do odbarvení pozadí gelu. Gel se uchovává v ustalovacím roztoku.

**Barvení gelů roztokem amoniakálního stříbra**

*Roztoky:* Fixační roztok, 10% roztok glutaraldehydu, roztok amoniakálního stříbra, vyvolávací roztok, ustalovací roztok, destilovaná voda

*Postup:*

- Před samotným barvením gel propláchnut 3x destilovanou vodou a následně převeden do fixačního roztoku na alespoň 30 minut, nebo přes noc při 4 °C.
- Gel se 30 minut rehydratuje destilovanou vodou, následně se inkubuje 30 minut s 10% roztokem glutaraldehydu. Gel se následně od glutaraldehydu promývá destilovanou vodou 6x 10 minut.

- Po promytí následuje inkubace s roztokem amoniakálního stříbra po dobu 15 minut na třepačce. Po inkubaci se gel promyje a vyvolává ve vyvolávacím roztoku do příslušného zbarvení. Gel se uchovává v ustalovacím roztoku.

### 3.7.2 Dot-blot

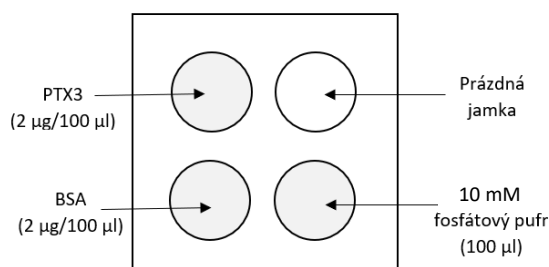
*Roztoky:* ekvilibrační a promývací roztok (PBS-T), blokovací roztok 5% BSA v PBS-T, roztok pro ředění protilátek 0,25% BSA v PBS-T, negativní kontrola 2 µg BSA na jamku, 10 mM fosfátový pufr pH 7,3, substrátový roztok Opti-4CN™ Substrate Kit, monoklonální specifické protilátky anti-PTX3, rekombinantní PTX3, sekundární anti-myší protilátky značené peroxidázou

*Pomůcky:* PVDF membrána Immuno-Blot™, dot-blot DHM 96 unit

*Přístroj:* Vakuový koncentrátor pro dot-blot

*Postup:*

- Ekvilibrovaná membrána musí být přenesena na aparaturu. Následně se membrána znovu ekvilibruje 2x PBS-T po 100 µl do jamky.
- Vzorky se dávkuje do čtverců po 4 jamkách po 100 µl dle obrázku 13.
- Membrána se promyje 100 µl PBS-T, vyjme z aparatury a nechá se uschnout.
- Membrána se rozdělí na jednotlivé čtverce dávkovaných vzorků.
- Následně se membrána blokuje 1 ml blokovacího roztoku 5% BSA v jamce misky po dobu 1 hodiny na třepačce.
- Čtverce membrány se 3x rychle promyjí 1 ml PBS-T.
- Následuje aplikace 1ml konjugátu ředěného 1:1000 na jamku a inkubuje se po dobu 1 hodiny na třepačce.
- Čtverce membrány se 3x rychle promyjí 1 ml PBS-T, následně se promyjí 3x 1 ml po 5 minutách.
- Aplikuje se substrátový roztok do každé jamky a inkubuje se 30 minut na třepačce.



**Obrázek 12:** Schéma pozic pro pipetování vzorku antigenu s kontrolami dot-blot

### 3.8 Vazba modelových protilátek na magnetické mikročástice

Pro následující metody byly zpočátku použity modelové protilátky, kterými byly lidské IgG standard z lidského séra bez definované specificity, následně se použily specifické protilátky párující se s odpovídajícím antigenem, konkrétně se jednalo o anti-chymotrypsinové protilátky třídy IgG s antigenem chymotrypsinem, jehož přítomnost na protilátkách byla následně ověřena štěpením proteinu ovalbuminu.

#### 3.8.1 Vazba IgG protilátek na částice s karboxylovými funkčními skupinami

*Roztoky:* 0,1 M MES pufr pH 5,0; 0,1 M PBS pufr pH 7,4; zásobní roztok hIgG 1 mg/ml

*Reagencie:* EDAC, S-NHS

*Magnetické částice:* Dynabeads™ MyOne™ Carboxylic Acid, velikost 1 μm

*Postup:*

- 1 mg magnetických částic Dynabeads MyOne Carboxylic Acid (= 100 μl) se 5x promyje 1,5 ml MES pufru.
- K magnetickým částicím se přidá 500 μl čerstvě připraveného roztoku skládajícího se z MES pufru, 7,5 mg EDAC a 1,25 mg S-NHS. Inkubuje se 10 minut na rotátoru při laboratorní teplotě.
- Systém se promyje 2x 1,5 ml MES pufru a přidá se roztok hIgG naředěný MES puftrem (50 μl hIgG + 950 μl MES pufru) – z tohoto roztoku se jímá původní frakce. Inkubuje se 3 hodiny na rotátoru při laboratorní teplotě. Jímá se vazebná frakce.
- Promytí 5x 1,5 ml PBS puftrem. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice s navázaným chymotrypsinem se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace IgG analyzují pomocí SDS-PAGE.

#### Ověření kovalentní vazby IgG molekul na magnetické částice Dynabeads-COOH rozvolněním IgG na H a L řetězce

*Roztoky:* 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3; 45 mM DTT; 100 mM IAA; 0,4 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> s 8 M ureou

*Postup:*

- 1 mg magnetických částic s imobilizovanými hIgG se promyje 3x 250 μl fosfátového pufru.



- K částicím se přidá 200  $\mu\text{l}$  roztoku 0,4 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  s 8 M ureou a 30  $\mu\text{l}$  DTT. Inkubuje se 15 minut ve vodní lázni při 50  $^\circ\text{C}$ .
- Po ochlazení na pokojovou teplotu se přidá 30  $\mu\text{l}$  IAA. Inkubuje se 10 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Jímá se vazebná frakce.
- Promyje se 1x 1 ml fosfátového pufru. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice s navázaným chymotrypsinem se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace IgG analyzují pomocí SDS-PAGE.

### 3.8.2 Vazba IgG protilátek na částice s hydrazidovými funkčními skupinami

*Roztoky:* Promývací a vazebný roztok: 0,1 M acetátový pufr pH 4,6 s 0,2 M NaCl; promývací roztok po blokaci: 0,1 M PBS pufr pH 7,4; zásobní roztok hIgG 1 mg/ml; oxidační činidlo: 0,02 M  $\text{NaIO}_4$ ; blokační roztok: 0,1 M DL-glyceraldehyd; ethylenglykol

*Magnetické částice:* SIMAG-Hydrazide, velikost 1  $\mu\text{m}$

*Postup:*

#### 1. Oxidace protilátek

- Ke 100  $\mu\text{l}$  roztoku hIgG se přidá 400  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{NaIO}_4$  a inkubuje se 30 minut na rotátoru ve tmě. Oxidace se zastaví 2  $\mu\text{l}$  ethylenglykolu a inkubuje se 10 minut na rotátoru ve tmě.
- Nezreagovaná činidla se odstraní pomocí Amicon kolonek centrifugací 10 minut při 13 000 rpm. Purifikované protilátky se získají otočením kolonky do čisté zkumavky a centrifugací 2 minuty při 3 500 rpm. Protilátky se doplní 990  $\mu\text{l}$  acetátového pufru. Jímá se původní frakce.

#### 2. Vazba protilátek na magnetické mikročástice

- 1 mg (= 20  $\mu\text{l}$ ) magnetických částic SIMAG-Hydrazide se promyje 5x 1,5 ml acetátového pufru. Přidá se roztok oxidovaných protilátek a inkubuje se přes noc na rotátoru při chladničkové teplotě. Jímá se vazebná frakce.
- Částice se promyjí 5x 1,5 ml acetátového pufru a následně blokují 500  $\mu\text{l}$  blokačního roztoku. Inkubuje se 1 hodinu na rotátoru.
- Promyje se 3x 1,5 ml acetátového pufru a 3x 1,5 ml PBS, ve kterém se částice uchovávají. Jímají se promývací frakce.

### 3.8.3 Vazba IgG protilátek na částice s proteinem A

*Roztoky:* 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl, roztok 2,5  $\mu$ M S-NHS ve fosfátovém pufru, hyperimunní prasečí sérum s anti-chymotrypsinovými protilátkami IgG

*Magnetické částice:* PureProteom Protein A Magnetic Beads – Millipore Corp., velikost 10  $\mu$ m

*Postup:*

- 100  $\mu$ l magnetických částic s proteinem A se promyje 3x 250  $\mu$ l fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15M NaCl.
- K promytým magnetickým částicím se přidá 250  $\mu$ l naředěného hyperimunního prasečího séra 1:1 fosfátovým pufrem (125  $\mu$ l séra +125  $\mu$ l pufru) – z tohoto roztoku jímána původní frakce. Inkubuje se 60 minut při pokojové teplotě na rotátoru. Jímá se vazebná frakce.
- Po inkubaci se systém promyje 5x 250  $\mu$ l fosfátového pufru. Jímají se promývací frakce.
- Inkubace 60 minut s 2,5  $\mu$ M roztokem S-NHS při laboratorní teplotě na rotátoru.
- Po inkubaci se systém promyje 5x 250  $\mu$ l fosfátového pufru. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace IgG analyzují pomocí SDS-PAGE.

### Ověření kovalentní vazby anti-chymotrypsinových protilátek na magnetické částice reakcí s chymotrypsinem metodou SDS-PAGE

*Roztoky:* 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3; 1 mg/ml zásobní roztok chymotrypsinu  $\alpha$  izolovaného z bovinního pankreatu

*Postup:*

- Ze zásobního roztoku chymotrypsinu o koncentraci 1 mg/ml se odebere 50  $\mu$ l (= 50  $\mu$ g), které jsou přidány k magnetickým částicím s imobilizovanými protilátkami. Z tohoto roztoku se jímá původní frakce. Inkubuje se v chladničkové teplotě na rotátoru po dobu 1 hodiny. Jímá se vazebná frakce.
- Systém se promyje 3x 500  $\mu$ l fosfátového pufru. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice a navázaného chymotrypsinu se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace IgG analyzují pomocí SDS-PAGE.

### **Ověření navázání chymotrypsinu štěpením ovalbuminu**

*Roztoky:* 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3; zásobní roztok ovalbuminu 1 mg/ml

*Postup:*

- 100  $\mu$ l ze zásobního roztoku ovalbuminu 1 mg/ml se přidá k magnetickým částicím s imobilizovanými specifickými protilátkami a chymotrypsinem. Z tohoto roztoku se jímá původní frakce. Inkubuje se na rotátoru při pokojové teplotě po dobu 4 hodin. Jímá se vazebná frakce.
- Promyje se 3x 1 ml fosfátového pufru. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice s navázaným chymotrypsinem se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace IgG analyzují pomocí SDS-PAGE.

### 3.9 Výběr a vazba specifických protilátek na magnetické mikročástice

Výrobce monoklonálních protilátek (Moravian Biotechnology, Brno, Česká republika) poskytl 21 různých klonů specifických myších monoklonálních protilátek proti rekombinantnímu PTX3, produkovaných hybridomovou metodou. Metodou dot-blot byla provedena identifikace a výběr klonů s nejvyšší vazebnou aktivitou (viz kapitola 3.7.2).

#### 3.9.1 Purifikace specifických protilátek pomocí nosiče s proteinem A

*Roztoky:* ekvilibrační pufr: 0,1 M fosfátový pufr pH 8,0 + 0,15 M NaCl, eluční pufr: 0,1 M glycinový pufr pH 2,8 + 0,15 M NaCl, roztok pro úpravu pH elucí: 0,1 M Tris-HCl pufr pH 9,5

*Pomůcky:* plastová kolona Bio-Spin objem 1,2 ml (kapacita nosiče 10 mg/ml), Affi-Gel Protein A Gel

*Protilátky:* kultivační médium obsahující monoklonální anti-PTX3 protilátky IgG<sub>1</sub>, myší, klon 6D9 (Moravian Biotechnology, Brno, Česká republika)

*Postup:*

- Plastová kolona se naplní do výše 1 ml Affi-Gelem s Proteinem A. Promyje se 10 ml ekvilibračního fosfátového pufru.
- Nanese se 1 ml kultivačního média s monoklonálními protilátkami. Jímá se vazebná frakce.
- Následně se kolonka promyje 6 ml fosfátového pufru. Jímají se promývací frakce.
- Protilátky se eluují 10 ml glycinového pufru, sbírají se jednotlivé eluční frakce protilátek. Do každé eluční frakce se přidá 25  $\mu$ l Tris-HCl pufru pro rychlou úpravu pH.
- Pomocí SDS-PAGE se provede kontrola, zda byly IgG protilátky na koloně zadrženy a následně eluovány.

#### 3.9.2 Příprava imunosorbentů pro pentraxin 3

**Vazba specifických protilátek na magnetické částice s proteinem A**

*Roztok:* 0,1 M fosfátový pufr pH 8,0 s 0,15 M NaCl

*Zdroj specifických protilátek:* a) kultivační médium obsahující monoklonální anti-PTX3 protilátky IgG klon 6D9, b) purifikované anti-PTX3 protilátky IgG klon 6D9

*Magnetické částice:* PureProteome Protein A Magnetic Beads, velikost 10  $\mu$ m

*Postup:*

**1. Vazba specifických protilátek přímo z kultivačního média (ad a) na magnetické částice**

- 300 µl suspenze magnetických částic s proteinem A se promyje 3x 1 ml fosfátového pufru.
- Inkubuje se s 500 µl roztoku protilátek (250 µl kultivačního média protilátek + 250 µl fosfátového pufru), ze kterého se jímá původní frakce, po dobu 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Jímá se vazebná frakce.
- Po inkubaci se systém promyje 10x 1 ml fosfátového pufru. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace analyzují pomocí SDS-PAGE.

**2. Vazba specifických protilátek purifikovaných z kultivačního média na koloně s proteinem A (ad b) na magnetické částice**

- 200 µl izolovaných protilátek se odsolí pomocí Amicon 100k centrifugací 10 minut při 13 000 rpm.
- Frakce odsolených protilátek o objemu 10 µl je získána centrifugací Amico kolonky po dobu 2 minut při 3 500 rpm. Jímána původní frakce.
- 300 µl suspenze magnetických částic s proteinem A se promyje 3x 1 ml fosfátového pufru.
- Magnetické částice se smíchají s 250 µl odsolených izolovaných protilátek a inkubují po dobu 30 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Jímá se vazebná frakce.
- Po inkubaci se magnetické částice promyjí 10x 1 ml fosfátového pufru. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace analyzují pomocí SDS-PAGE.

**Vazba specifických protilátek na magnetické částice s COOH skupinou**

*Roztoky:* 0,1 M MES pH 5,0; 0,1 M PBS pH 7,4; roztok EDAC 7,5 mg/0,5 ml; S-NHS 1,25 mg/0,5 ml

*Protilátky:* specifické monoklonální anti-PTX3 protilátky purifikované výrobcem pomocí kolonky s proteinem A – klon 1.1 a 7.1

*Magnetické částice:* Dynabeads™ MyOne™ Carboxylic Acid, SIMAG-COOH, velikost 1 μm

*Postup:*

### **1. Vazba specifických protilátek na magnetické částice Dynabeads-COOH**

- 100 μl suspenze magnetických částic (1 mg) se promyje 5x 100 μl MES pufru.
- Přidá se roztok EDAC 7,5 mg/0,5 ml pufru a objem se doplní do 1ml MES pufrům. Inkubuje se 30 minut při laboratorní teplotě na rotátoru. Promyje 2x 1 ml MES pufru.
- Přidá se 20 μg nebo 50 μg monoklonálních protilátek v objemu 1 ml, ze kterých jsou jímány původní frakce a inkubuje se přes noc při 4 °C na rotátoru. Jímají se vazebné frakce.
- Systém se promyje 3x 1 ml MES pufru, 2x 1 ml PBS pufru a 3x 1 ml MES pufru. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace analyzují pomocí SDS-PAGE.

### **2. Vazba specifických protilátek na magnetické částice SIMAG-COOH**

- 20 μl suspenze magnetických částic (1 mg) se promyje 5x 100 μl MES pufru.
- Přidá se roztok EDAC 7,5 mg/0,5 ml pufru a roztok S-NHS 1,25 mg/0,5 ml pufru. Inkubuje se 30 minut při laboratorní teplotě na rotátoru. Promyje 2x 1 ml MES pufru.
- Přidá se 30 μg monoklonálních protilátek v objemu 1 ml, ze kterého se jímá původní frakce a inkubuje se přes noc při 4 °C na rotátoru. Jímá se vazebná frakce.
- Systém se promyje 3x 1 ml MES pufru, 2x 1 ml PBS pufru a 3x 1 ml MES pufru. Jímají se promývací frakce.
- Pro zhodnocení účinnosti vazby protilátek na magnetické částice se alikvoty frakcí odebíraných během dílčích kroků imobilizace analyzují pomocí SDS-PAGE.

### 3.10 Příprava konjugátu na bázi silika nanočástic a kvantových teček

*Roztoky:* 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3; 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl

*Reagencie:* CdTe-COOH kvantové tečky, EDAC (0,5 mg/250  $\mu$ l), 0,02 M NaIO<sub>4</sub>, ethylenglykol

*Protilátky:* Polyklonální anti-PTX3 protilátky 1 mg/ml

*Nosič:* Silika nanočástice s NH<sub>2</sub> funkční skupinou (roztok 3 mg/200  $\mu$ l)

*Postup:*

#### 1. Příprava nanokompozitu SiNPs-QD

- Silika nanočástice se promyjí 5x 1 ml fosfátového pufru s následnou centrifugací 5 000 rpm 5 minut.
- Nanočástice se smíchají s 10  $\mu$ l CdTe-COOH a přidá se 250  $\mu$ l EDAC, objem ve zkumavce se doplní pufrům do 1 ml a inkubuje se 1 hodinu při pokojové teplotě.
- SiNPs-QD se centrifugují při 5 000 rpm 5 minut, promyjí se 3x 1 ml fosfátového pufru s 1 M NaCl a 2x se promyjí 1 ml fosfátového pufru bez NaCl pro odstranění nenavázaných složek.

#### 2. Aktivace protilátek oxidací pomocí NaIO<sub>4</sub>

- Hydroxylové skupiny glykosidického řetězce protilátek (20  $\mu$ g protilátek) se oxidují NaIO<sub>4</sub> pro vytvoření reaktivních aldehydových skupin reagujících následně s aminogrupami modifikovaných silika nanočástic.
- Inkubuje se 30 minut ve tmě na rotátoru, reakce se zastaví 1,5  $\mu$ l ethylenglykolu.
- Zbylé molekuly oxidačního činidla NaIO<sub>4</sub> se odsolí pomocí Amicon 100k centrifugací 10 minut při 13 000 rpm. Frakce odsolených protilátek o objemu 10  $\mu$ l se získala centrifugací po dobu 2 minut při 3 500 rpm.
- Aktivované protilátky se přidají k promytým SiNPs-QD a inkubují se přes noc na rotátoru při 4 °C.
- Biofunkcionalizované anti-PTX3 IgG protilátky se promyjí 3x 1 ml fosfátového pufru a zcentrifuguje se při 5 000 rpm 5 minut. Uchovává se ve fosfátovém pufru při 4 °C.

### 3.11 Elektrochemický průkaz pentraxinu 3 v modelovém vzorku

*Roztok:* 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3, PBS pufr pH 7,4

*Reagencie:* biokonjugát na bázi silika nanočástic a kvantových teček CdTe; 0,1 M HCl

*Antigen:* PTX3 20 ng/ml

*Imunosorbent:* magnetické částice se specifickou anti-PTX3 protilátkou (20 µg)

*Elektroda:* Tištěné elektrody s bizmutovým filmem BiSPCE

*Potenciostat:* Potenciostat PalmSens2 spojený se software PSTrace

*Postup:*

- 100 µl imunosorbentu (2 µg) se promyje 3x 1 ml fosfátového pufru pH 7,3.
- K imunosorbentu se přidá 100 µl PTX3 10 ng/ml nebo 20 ng/ml a inkubuje se 15 minut na rotátoru při laboratorní teplotě.
- Přidá se 25 µl biokonjugátu a objem zkumavky se doplní do 100 µl, inkubuje se 15 minut na rotátoru při laboratorní teplotě.
- Systém se inkubuje 3 minuty v 0,1 M HCl. 100 µl imunokomplexu se nanáší na tištěnou elektrodu ekvilibrovanou PBS pufrem.
- Pomocí tištěné elektrody a potenciostatu lze měřit elektrochemický signál atomů kovu Cd(II) uvolněného z kvantových teček konjugátu. Konkrétně byla použita metoda SWASV za podmínek: depoziční potenciál -1,0 V 120 s, kondiční potenciál -0,15 V 45 s, rozsah potenciálu od -1,0 do V -0,15 V, potenciálový krok 0,003 V, amplituda 0,02805 V a frekvence 25 Hz.



### 3.12 Elektrochemický průkaz pentraxinu 3 v plodové vodě

*Roztok:* 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3; PBS pufr pH 7,4

*Reagencie:* biokonjugát na bázi silika nanočástic a kvantových teček CdTe; 0,1 M HCl

*Vzorek:* vzorky pozitivní a negativní plodové vody ve vhodném ředění

*Imunosorbent:* 1 mg magnetických částic se specifickou anti-PTX3 protilátkou připravený dle protokolu v kapitole 3.9.2.

*Elektroda:* Tištěné elektrody s bizmutovým filmem BiSPCE

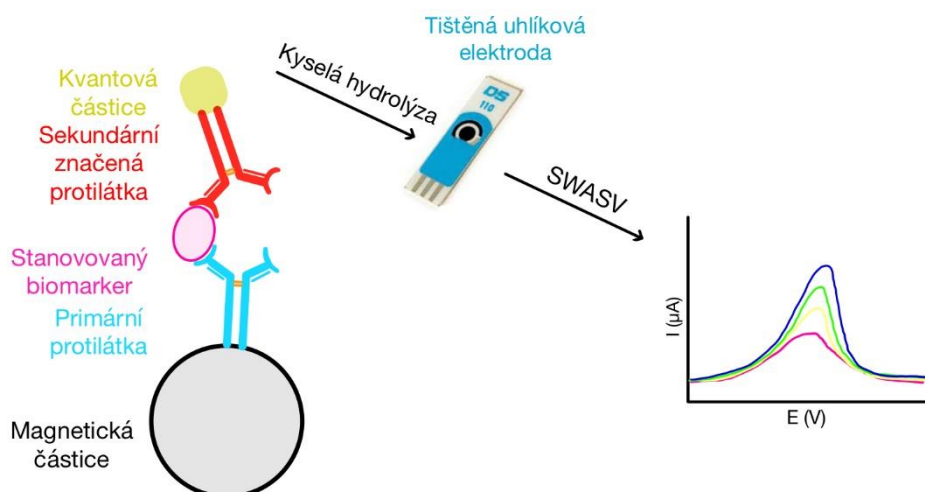
*Potenciostat:* Potenciostat PalmSens2 spojený se software PSTrace

*Postup:*

- 100  $\mu$ l imunosorbentu (2  $\mu$ g) se promyje 3x 1 ml fosfátového pufru pH 7,3.  
K imunosorbentu se přidá 100  $\mu$ l plodové vody vhodného ředění (1:1, 1:2, 1:4) a inkubuje se 15 minut na rotátoru při laboratorní teplotě.
- Poté se přidá 25  $\mu$ l biokonjugátu a objem zkumavky se doplní do 100  $\mu$ l, inkubuje se 15 minut na rotátoru při laboratorní teplotě.
- Magnetické částice se inkubují 5 minut v 0,1 M HCl. 100  $\mu$ l supernatantu s uvolněnými atomy Cd se nanaší na tištěnou elektrodu ekvilibrovanou PBS puftrem.
- Pomocí tištěné elektrody a potenciostatu lze měřit elektrochemický signál atomů kovu Cd(II) uvolněného z kvantových teček konjugátu. Konkrétně byla použita metoda SWASV za podmínek: depoziční potenciál -1,0 V 120 s, kondiční potenciál -0,15 V 45 s, rozsah potenciálu od -1,0 do V -0,15 V, potenciálový krok 0,003 V, amplituda 0,02805 V a frekvence 25 Hz.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro vyvíjený senzor na bázi imunomagnetické separace s elektrochemickou detekcí jsou hlavní 3 části: 1) imunosorbent skládající se z magnetických částic s kovalentně vázanými specifickými protilátkami, 2) biokonjugát skládající se ze sekundárních specifických protilátek s nanokompozitem na bázi silika nanočástic a kvantových teček, 3) elektrochemický průkaz antigenu s použitím tištěných elektrod a potenciostatu (obrázek 13).



**Obrázek 13:** Schéma senzoru na bázi imunomagnetické separace s elektrochemickou detekcí  
SWASV = Anodická rozpouštěcí „square wave“ voltametrie

Magnetické částice jsou hlavní součástí imunosorbentu. Jejich povrch může být modifikován různými funkčními skupinami, které následně reagují s funkčními skupinami specifických protilátek a vytváří stabilní, nejčastěji kovalentní vazbu. Díky specifitě použitých protilátek a superparamagnetickým vlastnostem magnetických částic je zajištěna pozitivní selekce požadovaného antigenu z komplexního vzorku. Pomocí tohoto senzoru bude možné simultánně prokazovat tři biomarkery zánětu v plodové vodě během jediné analýzy.

Pro elektrochemický průkaz 3 antigenů během jedné analýzy bylo stěžejní použití tzv. biokonjugátu. Ten poskytoval amplifikovaný signál, a to díky kovalentně vázanému nanokompozitu na bázi silika nanočástic a kvantových teček vázaných na sekundárních protilátkách. Pro průkaz každého ze tří antigenů byly použity kvantové tečky a nanočástice lišící se typem atomu kovu, aby nedošlo k překryvu získaných signálů po elektrochemické detekci. Kvantové tečky sloužily jako elektroaktivní značky, jejichž redukce kyselou hydrolyzou byla zachycena tištěnou elektrodou spojenou s potenciostatem a prokazovala přítomnost daného antigenu ve stanoveném vzorku.

Práce na této diplomové práci spočívala v několika krocích: a) kovalentně vázat modelové nebo specifické IgG molekuly na magnetické částice tak, aby byla co nejvyšší účinnost vazby a současně byla zachována jejich vaznost s antigenem, použít více typů vazby a vybrat tu nejvhodnější z hlediska účelu, b) purifikovat monoklonální protilátky vyrobené hybridomovou technikou, a to pomocí nosiče s vázaným proteinem A z vysoce komplexního kultivačního média a tyto molekuly IgG definované specifity použít pro přípravu imunosorbentu, c) ověřit, že takto připravený imunosorbent lze použít pro izolaci biomarkeru zánětu, PTX3, z plodové vody jako součást biosenzoru s elektrochemickou detekcí.

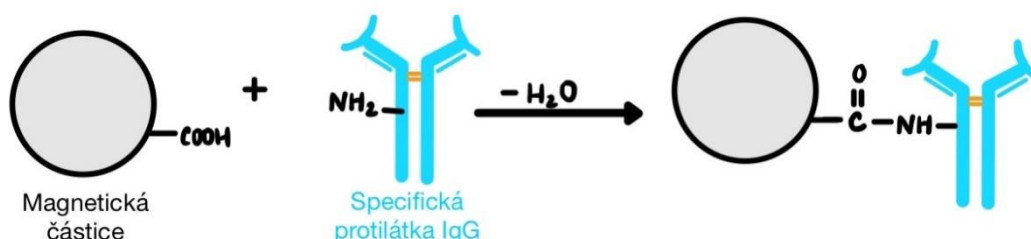
#### **4.1 Způsoby vazby modelových IgG protilátek na magnetické částice**

Pro vazbu specifických molekul IgG na magnetické částice (kap. 3.8 a 3.9) byly použity magnetické částice povrchově modifikované různými funkčními skupinami – karboxylovou funkční skupinou, hydrazidovou funkční skupinou. Dalším typem byly magnetické částice modifikované proteinem A. Všechny použité magnetické částice jsou uvedeny v kapitole 3.5.

Pro vazbu na magnetické částice byly k dispozici specifické myší monoklonální protilátky vytvořené hybridomovou technikou s rekombinantním PTX3 (kap. 3.1). Jednotlivé klony hybridomů byly testovány výrobcem Moravian Biotechnology na přítomnost specifických protilátek v kultivačním médiu a kultivační média s monoklonálními protilátkami byly předány k ověření reaktivity s cílovou strukturou, konkrétně PTX3, metodou dot-blot. Následně byly nejvíce reaktivní protilátky výrobcem reklonovány, izolovány a purifikovány metodou afinitní chromatografie na koloně s proteinem A. Pro tvorbu biokonjugátu byly také k dispozici komerční specifické polyklonální anti-PTX3 protilátky (kap. 3.1).

#### 4.1.1 Vazba IgG na magnetické částice s karboxylovými skupinami

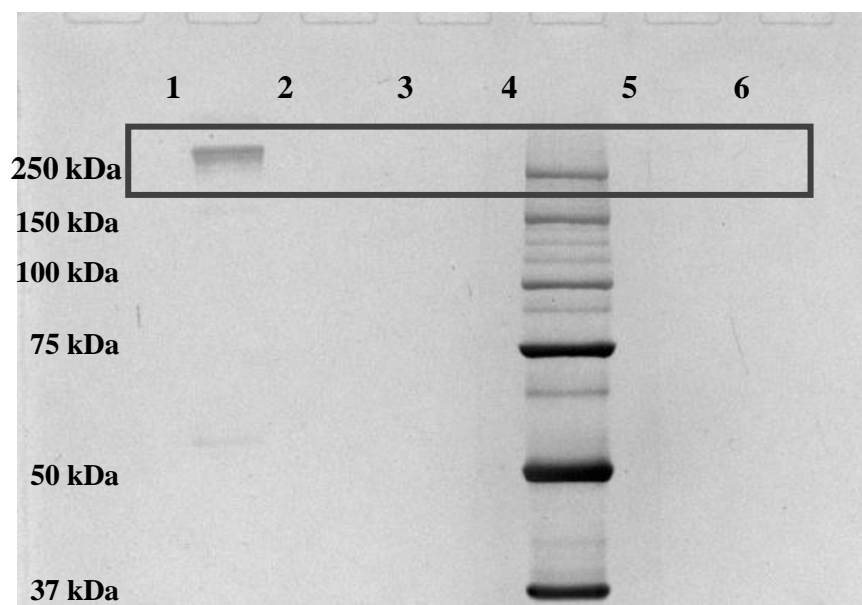
Specifické protilátky IgG jsou na magnetické částice s karboxylovými funkčními skupinami vázány tak, že karboxylová skupina COOH magnetických částic reaguje s aminoskupinou protilátek NH<sub>2</sub> za vzniku kovalentní vazby CO-NH (obrázek 14).



*Obrázek 14: Schéma kovalentní vazby karboxylové funkční skupiny magnetické částice s aminoskupinou protilátek NH<sub>2</sub> za vzniku kovalentní vazby CO-NH (obrázek 14).*

Jako první nosič byly použity magnetické částice Dynabeads-COOH. Před samotnou vazbou IgG na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou je důležitá aktivace magnetických částic pomocí EDAC, které aktivuje karboxylovou funkční skupinu na povrchu magnetických částic. Postup vazby IgG protilátek na magnetické částice Dynabeads-COOH je popsána v kapitole 3.8.1.

Pro vazbu nespecifických lidských IgG (hIgG) byl použit 1 mg magnetických částic Dynabeads™ MyOne™ Carboxylic Acid a 50 µg hIgG. Účinnost vazby protilátek na magnetické částice byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní frakci nespecifického hIgG v množství 0,5 µg na jamku, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 15.



**Obrázek 15:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po immobilizaci nespecifických hIgG na magnetické částice Dynabeads-COOH – výřez gelu

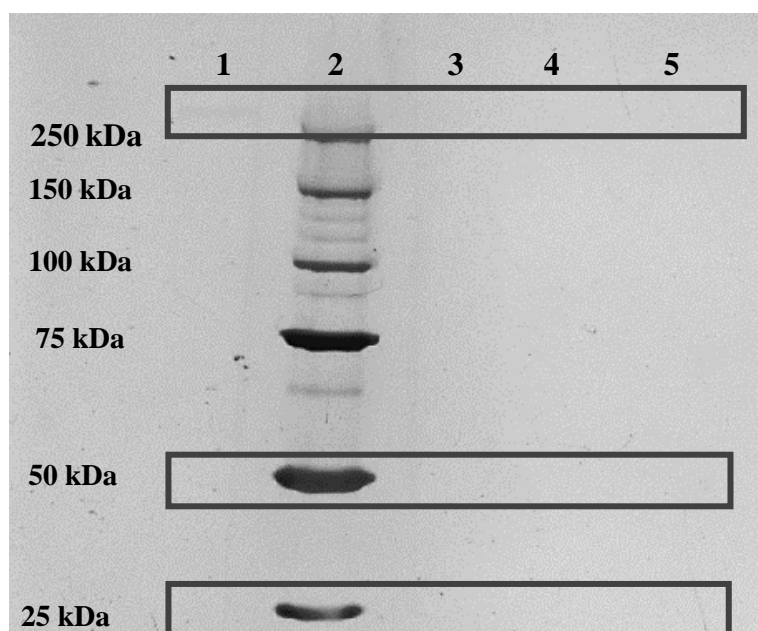
**1** – hIgG v množství 0,5 µg na jamku, **2** – vazebná frakce po inkubaci, **3** – první promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), **4** – molekulový marker, **5** – druhá promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), **6** – třetí promývací frakce (PBS pufr pH 7,4)

Ve frakci 1 je zřejmá přítomnost hIgG molekul, které byly přidány k magnetickým částicím. Porovnáním intenzity proužku frakce 1 a 2 je zřejmý úbytek hIgG po inkubaci s magnetickými částicemi. V promývacích frakcích 3, 5 a 6 není viditelný proužek, nedochází k vymývání IgG molekul z magnetických částic. Výsledek gelu potvrzuje 100% vyvázání hIgG protilátek na magnetické částice Dynabeads-COOH. Vazba protilátek na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou není z časového hlediska rychlou metodou z důvodu inkubací přes noc, ale poskytuje vysokou účinnost vazby protilátek s jejich větší stabilitou na magnetických částicích. Nevýhodou těchto částic je neorientovaná vazba protilátek na magnetické částice, která snižuje vazebnou kapacitu pro antigen. Pro ověření kovalentní vazby mezi IgG molekulami a magnetickými částicemi Dynabeads-COOH byl proveden navazující experiment.

### **Ověření kovalentní vazby IgG molekul na magnetické částice Dynabeads**

Pro ověření, že vazba mezi magnetickými částicemi a protilátkami je stabilní a že se nejedná o nespecifickou sorpci IgG molekul na povrch magnetických částic, byly částice přeneseny do prostředí, kde jsou všechny slabé nekovalentní vazby rozrušeny. IgG molekuly kovalentně vázány na magnetické částice zůstávají součástí imunosorbentu, nespecificky vázané IgG molekuly se uvolňují do kapalně fáze. Po elektroforetické analýze by u nespecificky vázaných IgG molekul byly přítomny na gelu přítomny IgG molekuly a jejich volné těžké (50 kDa) a lehké (25 kDa) řetězce. Postup experimentu je popsán v podkapitole 3.8.1.

1 mg magnetických částic Dynabeads-COOH obsahující na svém povrchu 50  $\mu$ g hIgG byl inkubován s elučními a denaturačními činidly obsahující ureu, DTT a IAA. Kontrola uvolnění protilátek byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly frakci nespecifického hIgG předředěného 1:32, eluční a promývací frakci. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 16.



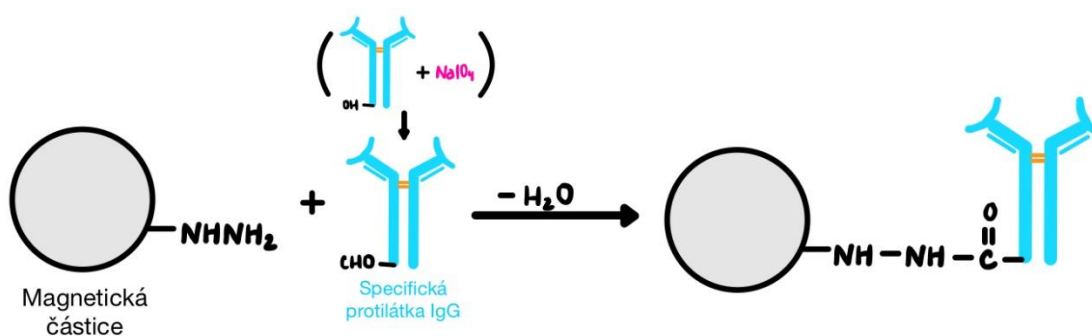
**Obrázek 16:** Analýza elučních a promývacích frakcí po rozvolnění hIgG protilátek z magnetických částic Dynabeads-COOH na jednotlivé řetězce – výřez gelu

1 – vzorek IgG ředěný 1:32 fosfátovým pufrům pH 7,3, 2 – molekulový marker,  
3 – eluční frakce po inkubaci s činidly, 4 – první promývací frakce

Ve frakci 1 je zřejmá přítomnost malého množství hIgG molekul předředených 1:32, které by v tomto ředění měly být na gelu viditelné. Tento ředěný vzorek hIgG sloužil pouze k porovnání přítomnosti volných protilátek v eluční frakci 3, ve které není zřejmá přítomnost hIgG molekul, ani uvolněných těžkých (50 kDa) či lehkých (25 kDa) řetězců. Stejně tak i v promývacích frakcích 4 a 5 nejsou přítomny hIgG molekuly či volné řetězce. Tento výsledek potvrzuje přítomnost stabilní vazby mezi magnetickými částicemi Dynabeads-COOH a IgG molekulami, zároveň se nepotvrdila nespecifická sorpce IgG molekul k magnetickým částicím. Část IgG molekul vázaných na magnetických částicích nemusí mít vhodnou orientaci pro vazbu antigenu.

#### 4.1.2 Vazba IgG na magnetické částice s hydrazidovými skupinami

Dalším dostupným nosičem byly magnetické částice s hydrazidovými funkčními skupinami. Použity byly magnetické částice obsahující na svém povrchu hydrazidové skupiny  $\text{NHNH}_2$ , které reagují s CHO skupinou oxidovaných protilátek. K oxidaci protilátek se použilo  $\text{NaIO}_4$ . Při vazbě oxidovaných protilátek na hydrazidové magnetické částice dochází ke vzniku hydrazidové vazby (obrázek 17).

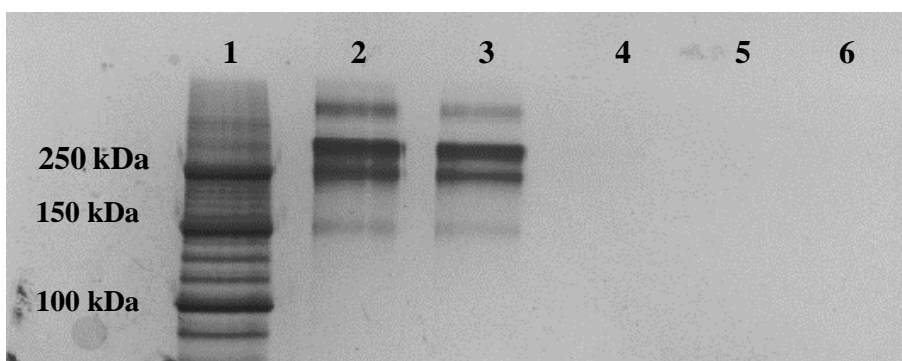


**Obrázek 17:** Schéma kovalentní vazby hydrazidové funkční skupiny magnetické částice s oxidovanou IgG molekulou

Před samotnou vazbou IgG molekul na magnetické částice s hydrazidovými funkčními skupinami (SIMG-Hydrazide) je důležitá oxidace protilátek pomocí činidla  $\text{NaIO}_4$ , které vytváří aldehydickou skupinu CHO z hydroxylové skupiny OH na terminálním monosacharidu glykosidického řetězce v Fc části IgG molekul. Tyto aldehydické skupiny mohou následně reagovat s hydrazidy přítomnými na magnetických částicích a vytváří kovalentní

vazbu. Postup vazby protilátek na magnetické částice SIMAG-Hydrazide je popsána v podkapitole 3.8.2.

Pro vazbu nespecifických lidských IgG (hIgG) byl použit 1 mg magnetických částic SIMAG-Hydrazide a 100 µg oxidovaných hIgG. Účinnost vazby protilátek na magnetické částice byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní frakci nespecifického hIgG v množství 1 µg na jamku, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 18.



**Obrázek 18:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po imobilizaci nespecifických hIgG na magnetické částice SIMAG-Hydrazide – výřez gelu

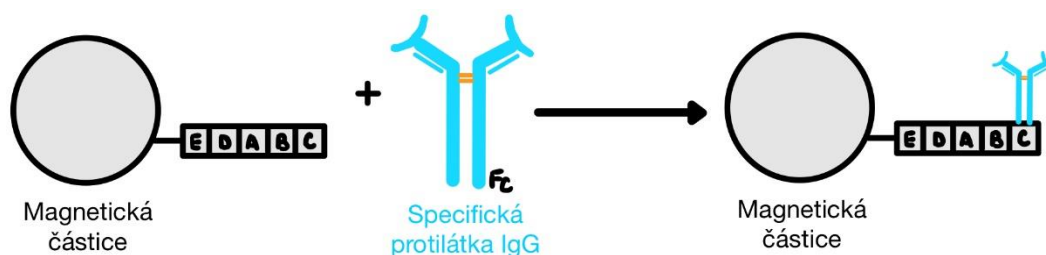
**1** – molekulový marker, **2** – hIgG v množství 1 µg na jamku, **3** – vazebná frakce po inkubaci, **4** – první promývací frakce (acetátový pufr pH 4,6), **5** – druhá promývací frakce (acetátový pufr pH 4,6), **6** – třetí promývací frakce (acetátový pufr pH 4,6)

Ve frakci 2 je zřejmá přítomnost hIgG molekul, které byly přidány k magnetickým částicím. Porovnáním intenzity frakce 2 a 3 nelze potvrdit úbytek hIgG ve vazebné frakci po inkubaci s magnetickými částicemi. V promývacích frakcích 4, 5 a 6 není viditelný proužek, nedochází k vymývání IgG molekul z magnetických částic. Denzitometrickým vyhodnocením gelu pomocí softwaru ImageLab bylo zjištěno, že účinnost vazby IgG molekul na magnetické částice SIMAG-Hydrazide je 17,4 %. Vazba pomocí hydrazidové funkční skupiny magnetických částic je oproti vazbě pomocí karboxylové funkční skupiny výhodná v tom, že OH skupina IgG molekul je přítomna na konci glykosidického řetězce Fc fragmentu IgG molekul. Díky tomu se IgG molekuly váží na magnetické částice orientovaně a všechna vazebná místa jsou stericcky přístupná pro antigen. Tento experiment prokázal malou účinnost vazby IgG molekul na magnetické částice.



### 4.1.3 Vazba IgG protilátek na magnetické částice s proteinem A

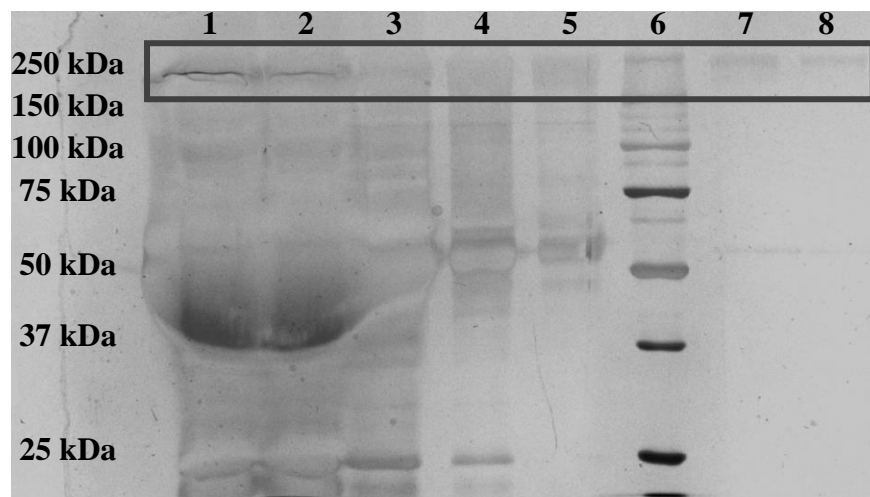
Dalším dostupným nosičem byly magnetické částice s proteinem A. Protein A váže specificky Fc části IgG molekul bez jejich úpravy, tzn. že se na magnetické částice váží nativní IgG molekuly bez rizika jejich chemického ovlivnění (obrázek 19).



*Obrázek 19: Schéma nekovalentní vazby magnetických částic s proteinem A a specifické IgG protilátky*

Pro vazbu na magnetické částice byla použita suspenze 100  $\mu$ l PureProteome Protein A Magnetic Beads. Na magnetické částice byly vázány specifické anti-chymotrypsinové IgG molekuly (anti-CHT) z hyperimunního prasečího séra o neznámém množství protilátek. Magnetické částice byly inkubovány se 125  $\mu$ l tohoto séra. Po vazbě protilátek na magnetické částice se tato vazba stabilizovala pomocí S-NHS činidla. Postup vazby je popsán v podkapitole 3.8.3.

Účinnost vazby protilátek na magnetické částice byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní frakci hyperimunního prasečího séra předředěného 1:1, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 20.



**Obrázek 20:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po imobilizaci anti-chymotrypsinových IgG protilátek na magnetické částice s proteinem A – výřez gelu

1 – ředěné hyperimunní prasečí sérum 1:1 pufrém, 2 – vazebná frakce po inkubaci, 3 – první promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,2 s NaCl), 4 – druhá promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,2 s NaCl), 5 – třetí promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,2 s NaCl), 6 – molekulový marker, 7 – první promývací frakce po vazbě S-NHS, 8 – druhá promývací frakce po vazbě S-NHS

Ve frakci 1 lze pozorovat vzorek hyperimunního prasečího séra, který byl přidán k magnetickým částicím. Porovnáním intenzity proužku IgG molekul ve frakci 1 a 2 je zřejmý úbytek IgG molekul. V promývacích frakcích 3, 4 a 5 není viditelný proužek, nedochází k vymývání IgG molekul z magnetických částic. Denzitometrickým vyhodnocením gelu pomocí softwaru ImageLab bylo zjištěno, že účinnost vazby IgG molekul na magnetické částice PureProteome Protein A Magnetic Beads je 51,4 %. Gel je přesycen z důvodu použití hyperimunního prasečího séra, které obsahuje i protilátky jiné třídy než IgG. Vazba protilátek na magnetické částice pomocí proteinu A je výhodnou metodou především díky orientované vazbě IgG molekul na magnetické částice a šetrnosti k nim. Dnes jsou k dispozici magnetické částice již modifikované proteinem A od výrobce, který udává, jakou afinitu má protein A k jakým druhovým protilátkám (tabulka 7). Použity byly prasečí IgG molekuly, které mají dle výrobce vysokou afinitu k proteinu A. Pro ověření vyvázání anti-CHT IgG molekul z hyperimunního prasečího séra byl proveden navazující experiment, a to vazbou chymotrypsinu na tyto protilátky.

**Tabulka 7: Afinita protilátek k proteinu A (Millipore Corp., Massachusetts, USA)**

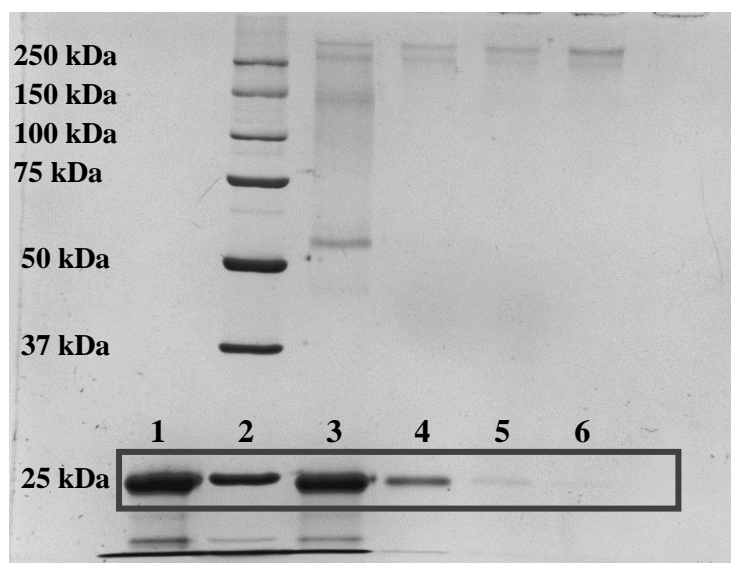
Key code for relative affinity of Protein A and G for respective antibodies:									
		++ = Strong affinity		+ = Moderate/slight affinity		+/- = Requires evaluation		- = No affinity	
	Protein A	Protein G		Protein A	Protein G		Protein A	Protein G	
Human IgG <sub>1</sub>	++	++	Mouse IgM	+/-	-	Sheep IgG	+/-	+	
Human IgG <sub>2</sub>	++	++	Rat IgG	++	++	Goat IgG	+/-	+	
Human IgG <sub>3</sub>	-	++	Rat IgG <sub>1</sub>	+/-	+	<b>Pig IgG</b>	<b>++</b>	++	
Human IgG <sub>2b</sub>	++	++	Rat IgG <sub>2a</sub>	+/-	++	Chicken IgG	-	+/-	
Human IgA	+	-	Rat IgG <sub>2b</sub>	+/-	+	<i>Fragments</i>			
Human IgD	+	-	Rat IgG <sub>2c</sub>	+/-	+	Human Fab	+	+	
Human IgE	+	-	Rat IgM	+/-	-	Human F(ab') <sub>2</sub>	+	+	
Human IgM	+	-	Rabbit IgG	++	++	Human scFv	+	-	
<b>Mouse IgG<sub>1</sub></b>	<b>+</b>	+	Hamster IgG	+	++	Human Fc	+	+	
Mouse IgG <sub>2a</sub>	++	++	Guinea Pig IgG	++	+	Human κ	-	-	
Mouse IgG <sub>2b</sub>	++	++	Bovine IgG	+	+	Human λ	-	-	
Mouse IgG <sub>3</sub>	+	++							

### **Ověření kovalentní vazby anti-chymotrypsinových protilátek na magnetické částice**

Z důvodu použití specifických anti-CHT protilátek bylo možné ověření jejich vazby na magnetické částice pomocí vazby antigenu. Chymotrypsin je proteolytický enzym o velikosti 25 kDa aktivní při pokojové teplotě, proto je při jeho vazbě důležitá teplota 4 °C.

Pro vazbu na imobilizované anti-CHT IgG molekuly na magnetických částicích s proteinem A bylo použito 50 µg α-chymotrypsinu izolovaného z hovězího pankreatu. Postup vazby je popsán v podkapitole 3.8.3.

Účinnost vazby chymotrypsinu na imobilizované IgG molekuly byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 12% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní frakci chymotrypsinu v množství 10 µg na jamku, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 21.



**Obrázek 21:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě chymotrypsinu na anti-chymotrypsinové IgG protilátky vázané na magnetických částicích s proteinem A – výřez gelu

1 – chymotrypsin v množství 10 µg na jamku, 2 – molekulový marker, 3 – vazebná frakce po inkubaci, 4 – první promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,3), 5 – druhá promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,3), 6 – třetí promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,3)

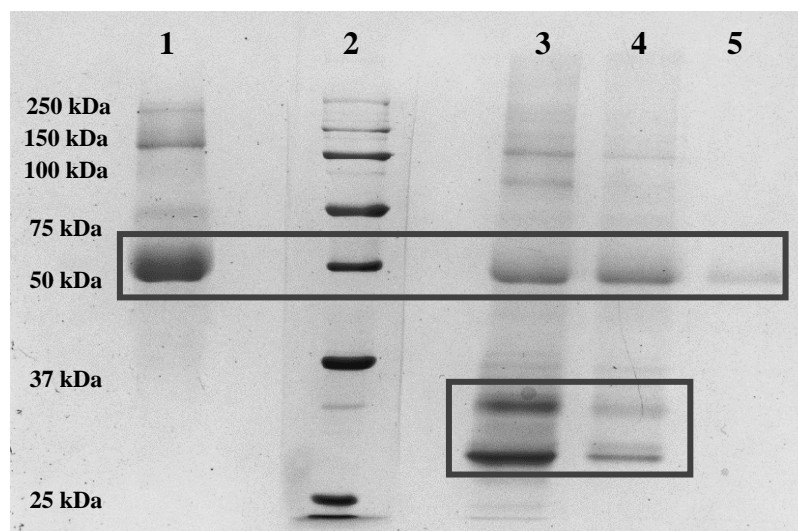
Ve frakci 1 je zřejmá přítomnost  $\alpha$ -chymotrypsinu, který byl přidán k imobilizovaným anti-CHT protilátkám na magnetických částicích. Porovnáním intenzity proužku chymotrypsinu ve frakci 1 a 3 je zřejmý malý úbytek chymotrypsinu. V promývacích frakcích 4, 5 a 6 je ještě zřejmá přítomnost vymývajících se molekul chymotrypsinu. Denzitometrickým vyhodnocením gelu pomocí softwaru ImageLab bylo zjištěno, že účinnost vazby chymotrypsinu na anti-CHT protilátky je 7,8 %. Z důvodu neznámého množství anti-CHT protilátek vyvázaných na magnetických částicích je možné, že došlo k jejich přesycení  $\alpha$ -chymotrypsinem. I přes nízkou účinnost vazby chymotrypsinu se jeho část navázala na nosič a bude tak vykazovat proteolytickou aktivitu. Pro ověření, že se chymotrypsin vyvázal na tyto protilátky bylo využito jeho proteolytické aktivity ke štěpení proteinu ovalbuminu.

#### ***Ověření specifické vazby chymotrypsinu na imunosorbent štěpením ovalbuminu***

Chymotrypsin je proteolytický enzym, proto nejjednodušším ověřením jeho vazby na anti-CHT IgG molekuly je prokázání proteolytické aktivity nosiče štěpením proteinu, například ovalbuminu. Jedná se o albumin vaječného bílku o molekulové hmotnosti 43 kDa.

Pro štěpení bylo použito 100 µg ovalbuminu. Postup vazby je popsán v kapitole 3.8.3. Účinnost chymotrypsinu vázaného na imobilizovaných protilátkách byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 12% polyakrylamidový gel obarvený roztokem

amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní vzorek ovalbuminu v množství 10 µg na jamku, frakci po štěpení a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 22.



**Obrázek 22:** Analýza štěpných a promývacích frakcí po štěpení ovalbuminu vázaným chymotrypsinem na anti-chymotrypsinových protilátkách – výřez gelu

**1** – ovalbumin v množství 10 µg na jamku, **2** – molekulový marker, **3** – frakce po štěpení, **4** – první promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,3), **5** – druhá promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,3)

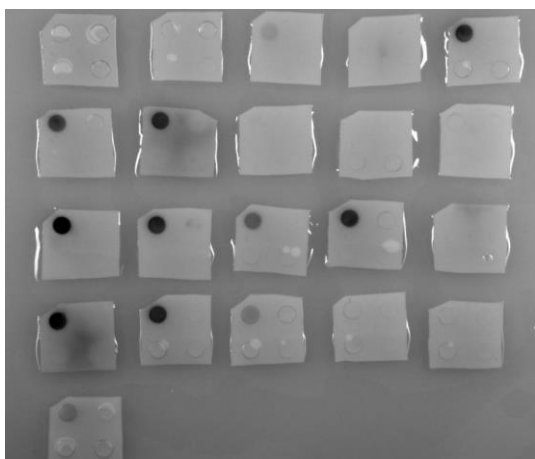
Ve frakci 1 je zřejmá přítomnost ovalbuminu, který byl přidán k chymotrypsinu vázanému na imobilizovaných anti-CHT protilátkách. Porovnáním frakce 1 a 3 jsou ve frakci 3 viditelné štěpné fragmenty ovalbuminu. V promývací frakci 4 je zřejmá přítomnost vymývaných štěpných fragmentů ovalbuminu, v promývací frakci 4 je zřejmá přítomnost pouze vymývaného ovalbuminu. Na základě přítomnosti štěpných fragmentů ovalbuminu byla potvrzena přítomnost chymotrypsinu na anti-CHT protilátkách vázaných na magnetických částicích s proteinem A.

## 4.2 Výběr specifických monoklonálních protilátek

Z důvodu vysokých cen komerčních monoklonálních protilátek proti PTX3 byla oslovena firma Moravian Biotechnology se sídlem v Brně s cílem zajistit specifické monoklonální protilátky hybridomovou technikou s dodaným antigenem – rekombinantním PTX3. Firma poskytla 21 klonů monoklonálních protilátek v kultivačních médiích obsahující spoustu nutričních látek. Úkolem bylo si z těchto klonů vybrat nejvíce reaktivní klony, které výrobce následně reklonoval a purifikoval nosičem s proteinem A. Ke zjištění reaktivity protilátek byla provedena metoda dot-blot, která je popsána v podkapitole 3.7.2.

Na obrázku 23 lze pozorovat výsledek metody dot-blot. Pokud specifická anti-PTX3 protilátka vykazovala reaktivitu k rekombinantnímu PTX3, zbarvila se jamka v levém horním rohu. Intenzita zbarvení jamky koreluje se silou reaktivity protilátky. Z obrázku 24 lze vyhodnotit, že 12 klonů z 21 vykazovalo reaktivitu s dodaným rekombinantním PTX3. 10 nejvíce reaktivních klonů bylo reklonováno výrobcem a použito pro výrobu imunosorbentů pro PTX3. Za nejlepší a nejvíce reaktivní klon byl označen klon protilátek 6D9, který byl po reklonování výrobcem přejmenován na klon 1.1.

Z tohoto důvodu jsou ve výsledcích přípravy imunosorbentů připravovány imunosorbenty nejdříve z IgG<sub>1</sub> molekul klon 6D9, následně z IgG<sub>1</sub> molekul klon 1.1. Klon 6D9 byl výrobcem dodán v kultivačním médiu, ze kterého byl připravován první imunosorbent. Následně byly tyto IgG<sub>1</sub> molekuly izolovány pomocí kolonky s proteinem A a použity k tvorbě dalšího imunosorbentu. IgG<sub>1</sub> molekuly klon 1.1 byly již výrobcem purifikovány a připraveny k experimentům.



**Obrázek 24:** Afinita specifických protilátek k PTX3, metoda dot-blot

Bezbarvý kruh = nereaktivní  
Tmavý kruh = vysoká reaktivita



**Obrázek 23:** Vyhodnocení reaktivity klonů monoklonálních protilátek metodou dot-blot

Modrá barva = nereaktivní  
Žlutá barva = reaktivní

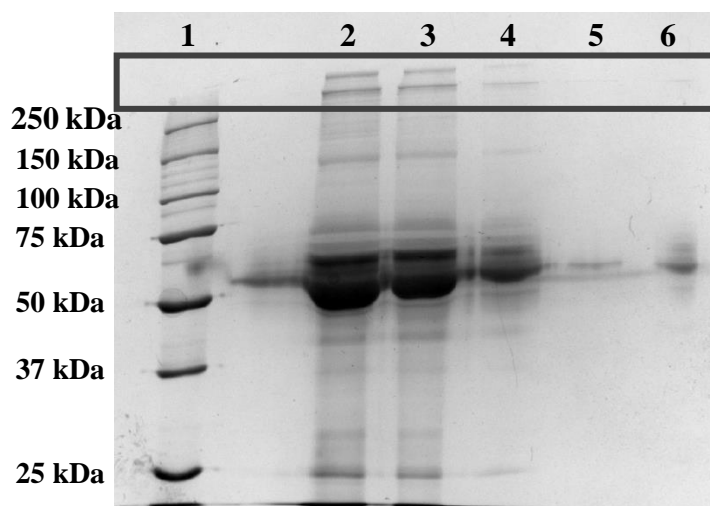
### 4.3 Příprava imunosorbentů pro pentraxin 3

Cílem přípravy imunosorbentů bylo vytvořit vhodný imunosorbent pro PTX3 obsahující maximální množství správně orientovaných specifických anti-PTX3 IgG protilátek. Pro tvorbu imunosorbentů byly použity magnetické částice s karboxylovými funkčními skupinami a magnetické částice s proteinem A.

#### 4.3.1 Imunosorbenty z magnetických částic s proteinem A

Pro první imunosorbent byly vybrány magnetické částice s proteinem A, na které byly vázány specifické anti-PTX3 IgG molekuly. Jednalo se o myší protilátku třídy IgG<sub>1</sub>, ke kterým má protein A nižší afinitu, než k dříve použitým prasečím anti-CHT IgG (tabulka 7).

První imunosorbent z magnetických částic PureProteome Protein A Magnetic Beads (1 mg) byl proveden s použitím kultivačního média IgG molekul klonu 6D9 bez jejich předchozí izolace, pouze po naředění 1:1 fosfátovým pufrům. Postup vazby IgG molekul je popsán v kapitole 3.9.2. Účinnost vazby na magnetické částice byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkové na gel zahrnovaly původní frakci kultivačního média s IgG molekulami klonu 6D9 předředěného 1:1, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 25.

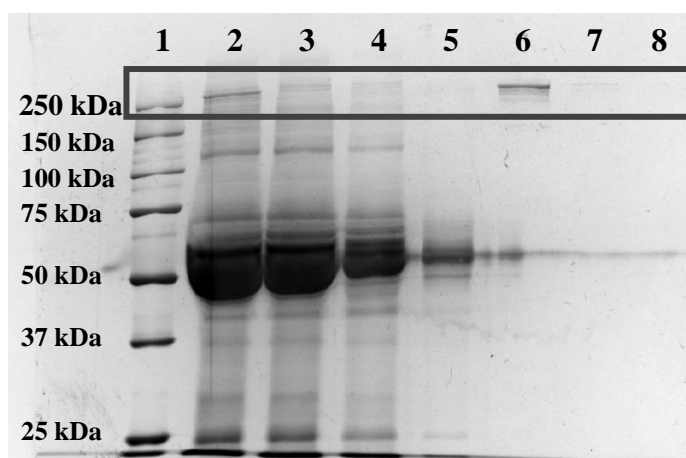


**Obrázek 25:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě specifických anti-PTX3 IgG molekul 6D9 z kultivačního média na magnetické částice s proteinem A – výřez gelu

1 – molekulový marker, 2 – kultivační médium s IgG molekulami klonu 6D9 ředěné 1:1, 3 – vazebná frakce po inkubaci, 4 – první promývací frakce (fosfátový pufr pH 8 s NaCl), 5 – druhá promývací frakce (fosfátový pufr pH 8 s NaCl), 6 – třetí promývací frakce (fosfátový pufr pH 8 s NaCl)

Ve frakci 2 lze pozorovat původní frakci kultivačního média s IgG molekulami klonu 6D9, které bylo přidáno k magnetickým částicím. Porovnáním intenzity proužku ve frakci 2 a 3 je zřejmý malý úbytek IgG molekul. V promývací frakci 4 je viditelné vymývání IgG molekul z magnetických částic, promývací frakce 5 a 6 již neobsahují žádné IgG molekuly. Denzitometrickým vyhodnocením gelu pomocí softwaru ImageLab bylo zjištěno, že účinnost vazby IgG molekul klonu 6D9 z kultivačního média na magnetické částice částic Pure-Proteome Protein A Magnetic Beads je 9 %. Z důvodu nízké účinnosti vazby IgG molekul přímo z média byla provedena jejich purifikace pomocí kolonky s proteinem A. Purifikace a izolace IgG molekul je popsána v kapitole 3.9.1.

Účinnost izolace a purifikace specifických IgG molekul klonu 6D9 z kultivačního média byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní frakci kultivačního média s IgG molekulami klonu 6D9, vazebnou frakci a eluční frakce. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 26.



**Obrázek 26:** Analýza vazebných a elučních frakcí po izolaci IgG molekul 6D9 na kolonce s proteinem A – výřez gelu

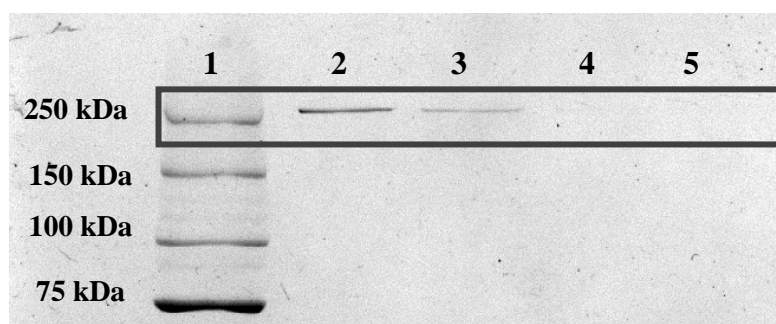
1 – molekulový marker, 2 – médium s IgG molekulami klonu 6D9, 3 – vazebná frakce, 4 – první promývací frakce (fosfátový pufr pH 8 s NaCl), 5 – druhá promývací frakce (fosfátový pufr pH 8 s NaCl), 6 – první eluční frakce následně použitá k přípravě imunosorbentu, 7 – druhá eluční frakce, 8 – třetí eluční frakce

Ve frakci 2 lze pozorovat frakci kultivačního média s IgG molekulami klonu 6D9. Porovnáním intenzity proužku frakce 2 a 3 je zřejmý úbytek IgG molekul po průchodu kolonkou. Promývací frakce 4 obsahuje malé množství IgG molekul, promývací frakce 5 již



neobsahuje IgG molekuly. Frakce 6 po eluci glycinovým pufrém obsahuje IgG molekuly vyizolované z média pomocí kolony s proteinem A. Denzitometrickým vyhodnocením gelu pomocí softwaru ImageLab bylo zjištěno, že účinnost izolace IgG molekul klonu 6D9 pomocí kolony s proteinem A je 87,2 %. Tento výsledek potvrzuje izolaci anti-PTX3 IgG molekul z kultivačního média. Eluční frakce 6 byla následně použita pro tvorbu imunosorbentu z izolovaných IgG molekul klonu 6D9.

Imunosorbent z izolovaných IgG molekul klonu 6D9 byl proveden použitím 1 mg magnetických částic PureProteome Protein A Magnetic Beads, na které se vázalo neznámé množství anti-PTX3 izolovaných IgG molekul. Postup vazby je popsán v kapitole 3.9.2. Účinnost vazby na magnetické částice byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní frakci izolovaných IgG molekul klonu 6D9, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 27.



**Obrázek 27:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě izolovaných specifických anti-PTX3 IgG molekul 6D9 na magnetické částice s proteinem A – výřez gelu

**1** – molekulový marker, **2** – izolované IgG molekuly klonu 6D9, **3** – vazebná frakce po inkubaci, **4** – první promývací frakce (fosfátový pufr pH 8 s NaCl), **5** – druhá promývací frakce (fosfátový pufr pH 8 s NaCl)

Ve frakci 2 je zřejmá přítomnost izolovaných anti-PTX3 IgG molekul, které byly přidány k magnetickým částicím. Porovnáním intenzity proužku ve frakci 2 a 3 je zřejmý úbytek IgG molekul po inkubaci s magnetickými částicemi. V promývacích frakcích 4 a 5 nejsou přítomny žádné IgG molekuly, nedochází k vymývání IgG molekul z magnetických částic. Denzitometrickým vyhodnocením gelu pomocí softwaru ImageLab bylo zjištěno, že účinnost vazby IgG molekul na magnetické částice PureProteome Protein A

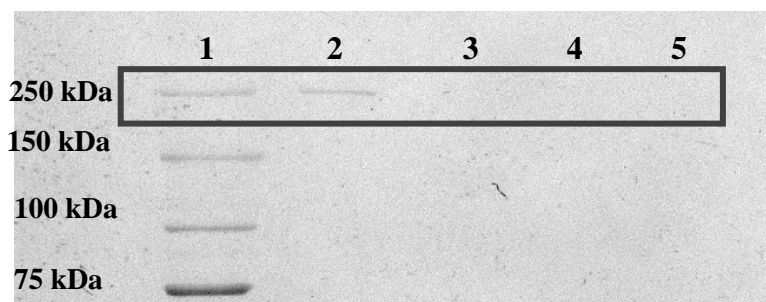
Magnetic Beads je 78 %. Tento výsledek potvrzuje navázání IgG molekul na magnetické částice.

#### 4.3.2 Imunosorbenty z magnetických částic s karboxylovými skupinami

Jako další nosič pro tvorbu imunosorbentu byly použity magnetické částice Dynabeads s karboxylovými funkčními skupinami. Pro tvorbu imunosorbentu byly použity specifické anti-PTX3 IgG molekuly purifikované přímo výrobcem pomocí kolony s proteinem A.

Pro tvorbu imunosorbentu byl použit 1 mg magnetických částic s karboxylovými funkčními skupinami (Dynabeads-COOH) a 20 µg anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1. Postup vazby IgG molekul je popsán v kapitole 3.9.2.

Účinnost vazby na magnetické částice byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní vzorek anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1 v množství 0,2 µg na jamku, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 28.



**Obrázek 28:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě specifických anti-PTX3 IgG molekul 1.1 (20 µg) na magnetické částice Dynabeads-COOH – výřez gelu

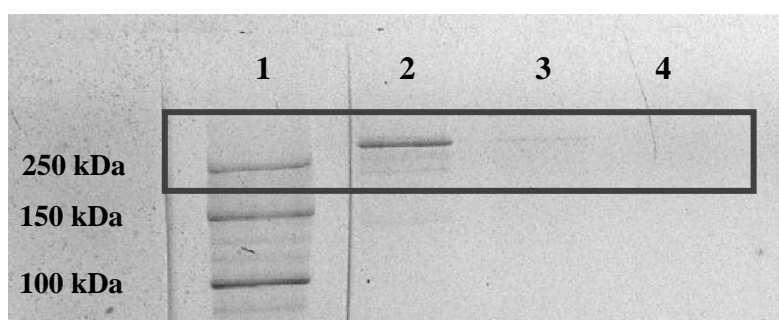
**1** – molekulový marker, **2** – anti-PTX3 IgG molekuly klon 1.1 v množství 0,2 µg na jamku, **3** – vazebná frakce po inkubaci, **4** – první promývací frakce (MES pufr, pH 5,0), **5** – druhá promývací frakce (MES pufr, pH 5,0)

Ve frakci 2 je zřejmá přítomnost anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1, které byly přidány k magnetickým částicím. Porovnáním intenzity proužku ve frakci 2 a 3 je zřejmý úbytek anti-PTX3 IgG molekul. V promývacích frakcích 4 a 5 nejsou přítomny IgG molekuly, nedochází k vymývání IgG molekul z magnetických částic. Tento výsledek potvrzuje 100% vyvázání specifických anti-PTX3 IgG molekul na magnetické částice Dynabeads-COOH. Tento typ magnetických částic je vhodný pro tvorbu imunosorbentu díky vysoké účinnosti

vazby a stability protilátek. Nejedná se o vazbu orientovanou, takže může docházet k sterické zábraně při vazbě antigenu a tím ke snížení účinnosti imunosorbentu.

Pro tvorbu dalšího imunosorbentu s magnetickými částicemi Dynabeads-COOH byl použit 1 mg magnetických částic s karboxylovými funkčními skupinami (Dynabeads-COOH) a 50 µg anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1. Postup vazby protilátek je popsán v kapitole 3.9.2.

Účinnost vazby na magnetické částice byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní frakci anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1 v množství 0,5 µg na jamku, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 29.



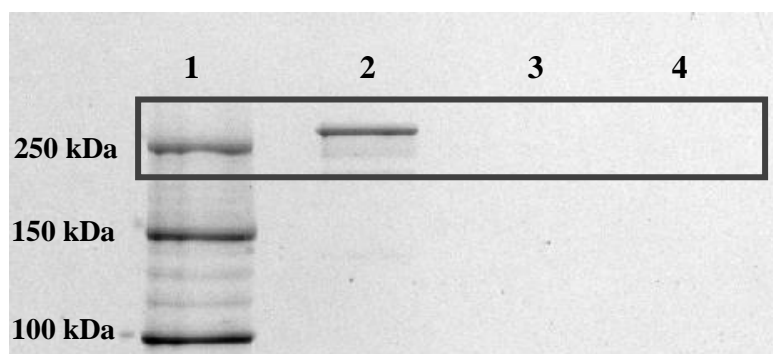
**Obrázek 29:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě specifických anti-PTX3 IgG molekul 1.1 (50 µg) na magnetické částice Dynabeads-COOH – výřez gelu

1 – molekulový marker, 2 – anti-PTX3 IgG molekuly klonu 1.1 v množství 0,5 µg na jamku, 3 – vazebná frakce po inkubaci, 4 – první promývací frakce (MES pufr pH 5,0)

Ve frakci 2 je zřejmá přítomnost anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1, které byly přidány k magnetickým částicím. Porovnáním intenzity proužku ve frakci 2 a 3 je zřejmý úbytek IgG molekul po inkubaci s magnetickými částicemi. Denzitometrickým vyhodnocením gelu pomocí softwaru ImageLab bylo zjištěno, že účinnost vazby na magnetické částice Dynabeads-COOH je 90 %. V promývací frakci 4 nejsou přítomny IgG molekuly, nedochází k vymývání IgG molekul z magnetických částic. Tento výsledek potvrzuje navázání anti-PTX3 IgG molekul na magnetické částice Dynabeads-COOH. Pro tvorbu imunosorbentu se osvědčilo použití pouze 20 µg anti-PTX3 IgG molekul, což je vhodné i z finančního hlediska.

Jako další nosič pro tvorbu imunisorbentu byly použity magnetické částice SIMAG-COOH. Pro tvorbu imunisorbentu byl použit 1 mg magnetických částic s karboxylovými funkčními skupinami (SIMAG-COOH) a 30  $\mu\text{g}$  anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1. Postup vazby je popsán v kapitole 3.9.2.

Účinnost vazby na magnetické částice byla hodnocena pomocí metody SDS-PAGE. Použit byl 10% polyakrylamidový gel obarvený roztokem amoniakálního stříbra. Hlavní frakce dávkované na gel zahrnovaly původní frakci anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1 v množství 0,3  $\mu\text{g}$  na jamku, vazebnou frakci a frakce promývací. Gel byl hodnocen pomocí stanice ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab. Vyhodnocení gelu je na obrázku 30.



**Obrázek 30:** Analýza vazebných a promývacích frakcí po vazbě specifických anti-PTX3 IgG molekul 1.1 (30  $\mu\text{g}$ ) na magnetické částice SIMAG-COOH – výřez gelu

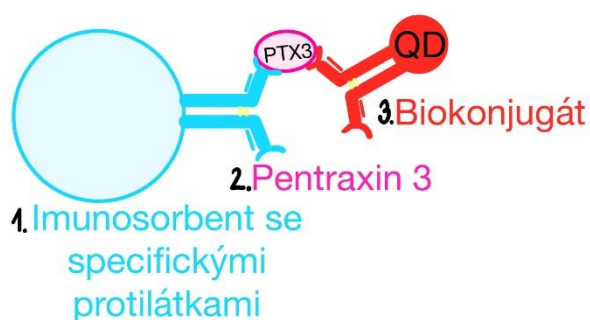
1 – molekulový marker, 2 – IgG molekuly klonu 1.1 (0,3  $\mu\text{g}$ ), 3 – vazebná frakce po inkubaci, 4 – první promývací frakce

Ve frakci 2 je zřejmá přítomnost anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1, které byly přidány k magnetickým částicím. Porovnáním intenzity proužku ve frakci 2 a 3 je zřejmý úbytek IgG molekul po inkubaci s magnetickými částicemi. V promývací frakci 4 nejsou přítomny IgG molekuly, nedochází k vymývání IgG molekul z magnetických částic. Tento výsledek potvrzuje 100% vyvázání všech anti-PTX3 IgG molekul na magnetické částice SIMAG-COOH.

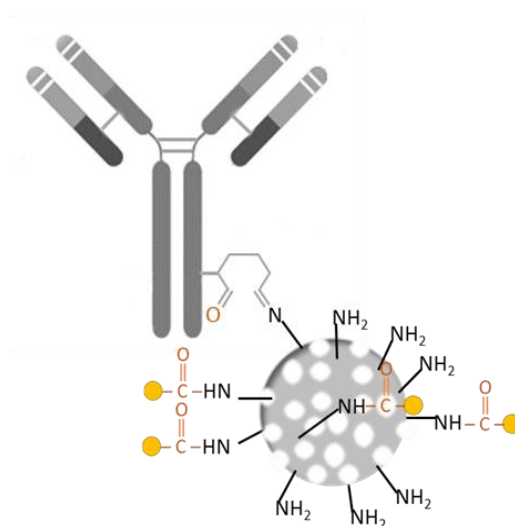
Pro tvorbu finálního imunisorbentu pro PTX3 byly vybrány magnetické částice s karboxylovými funkčními skupinami, které vykazují 100% účinnost vazby anti-PTX3 IgG molekul klonu 1.1 proti PTX3. Vybrány byly magnetické částice Dynabeads-COOH s 20  $\mu\text{g}$  vázaných anti-PTX3 IgG molekul 1.1 a magnetické částice SIMAG-COOH s 30  $\mu\text{g}$  vázaných anti-PTX3 IgG molekul 1.1. Takto připravené imunisorbenty sloužily ke specifickému vycytání PTX3 z plodové vody.

#### 4.4 Ověření funkce imunosorbentu pro záchyt pentraxinu 3

Cílem bylo vyvinout takový imunosorbent, který specificky vychytává PTX3 z plodové vody. Jako nejlepší nosič specifických IgG molekul byly vybrány magnetické částice s karboxylovými funkčními skupinami (kapitola 4.3), které s anti-PTX3 IgG molekulami klonu 1.1 vytváří kovalentní vazbu. Experimenty byly prováděny s modelovými vzorky obsahujícími rekombinantní PTX3 v prostředí pufru, následně byly prováděny s plodovou vodou. Pro elektrochemický průkaz biomarkeru jsou stěžejní 3 části imunokomplexu (obrázek 31): 1) imunosorbent se specifickými anti-PTX3 protilátkami, 2) roztok pufru s daným množstvím PTX3 a 3) biokonjugát sestávající ze silika nanočástic a kvantových teček Cd vázaných na sekundární protilátky (obrázek 32).



*Obrázek 31: Schéma imunokomplexu k elektrochemické detekci*



*Obrázek 32: Schéma biokonjugátu sestávajícího ze silika nanočástic a kvantových teček vázaných na sekundární protilátky (poskytnuto doc. RNDr. Lucií Koreckou, Ph.D.)*

Po kyselé hydrolyze imunokomplexu kyselinou chlorovodíkovou se v případě PTX3 měří přeměna Cd(II) na Cd(I) uvolněného z kvantových teček přítomných v biokonjugátu, která je úměrná množství PTX3. Současně s modelovým vzorkem musí být proměřena i negativní kontrola pro zjištění nespecifické sorpce biokonjugátu k imunosorbentu. Před každou aplikací vzorku na tištěnou elektrodu musí proběhnout její ekvibrace pomocí PBS pufru. Pokud není signál PBS pufru stálý a minimální, použije se nová tištěná elektroda, která se znovu ekvilibruje, dokud nezískáme stabilní signál.

Následující experimenty byly prováděny ve spolupráci s Gylxhane Kastrati a Granitem Jasharim. Jako první se proměřily samotné vytvořené imunosorbenty z magnetických částic Dynabeads-COOH. Postup je popsán v kapitole 3.11. Jednotlivé imunosorbenty obsahující 2 µg anti-PTX3 IgG protilátek byly inkubovány s biokonjugátem obsahujícím 0,5 µg sekundárních protilátek. Po kyselé hydrolyze pomocí HCl byly vzorky dávkovány na ekvilibrovanou tištěnou elektrodu PBS pufrům a elektrochemicky poměřeny. Cílem bylo získat informaci o imunosorbentu s nejnižším pozadím, který byl následně použit. Proměřeny byly 3 hlavní imunosorbenty z magnetických částic Dynabeads-COOH s 20 µg anti-PTX3 protilátek klonu 1.1. Nejlepší výsledek vykazoval imunosorbent 2 s nejmenší odezvou (tabulka 8), který byl dále použit.

*Tabulka 8: Výběr vhodného imunosorbentu na základě nespecifické sorpce biokonjugátu*

<b>Imunosorbent</b>	<b>Datum přípravy</b>	<b>Proud (µA)</b>	<b>Koncentrace (ng/ml)</b>
IS 1	7. 03. 2022	96	0
IS 2	22. 03. 2022	40	0
IS 3	18. 03. 2022	133	0

Experimenty s reálným vzorkem, tj. s plodovou vodou byly založeny nejdříve na nalezení vhodného ředění této komplexní biologické matrice pro elektrochemickou analýzu, následně byla ověřena funkčnost imunosorbentu v plodové vodě spikváním negativního vzorku plodové vody.

#### 4.4.1 Vhodné ředění plodové vody

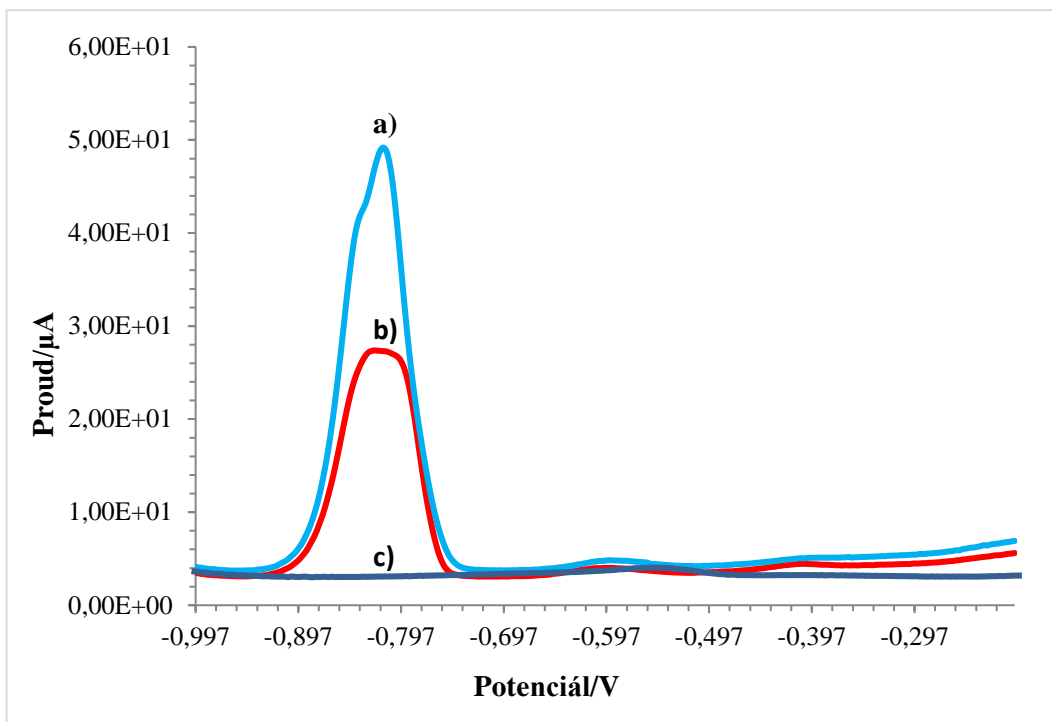
Plodová voda je složitá biologická matrice obsahující spoustu proteinů a dalších nutričních látek, které by mohly ovlivnit samotnou analýzu. Proto je při její analýze důležité ředění ve vhodném poměru a s vhodným pufrům.

Postup analýzy plodové vody je popsán v kapitole 3.12. Použit byl imunosorbent z magnetických částic Dynabeads-COOH s 20  $\mu\text{g}$  anti-PTX3 IgG protilátek klonu 1.1 z kapitoly 4.3.2. Pozitivní a negativní vzorky plodové vody z kapitoly 3.1 se inkubovaly s imunosorbentem, následně s biokonjugátem. Po hydrolyze HCl byl supernatant nad magnetickými částicemi dávkován na tištěnou elektrodu ekvilibrovanou PBS a elektrochemicky změřen pomocí potenciostatu PalmSens2 spojeným se software PSTrace.

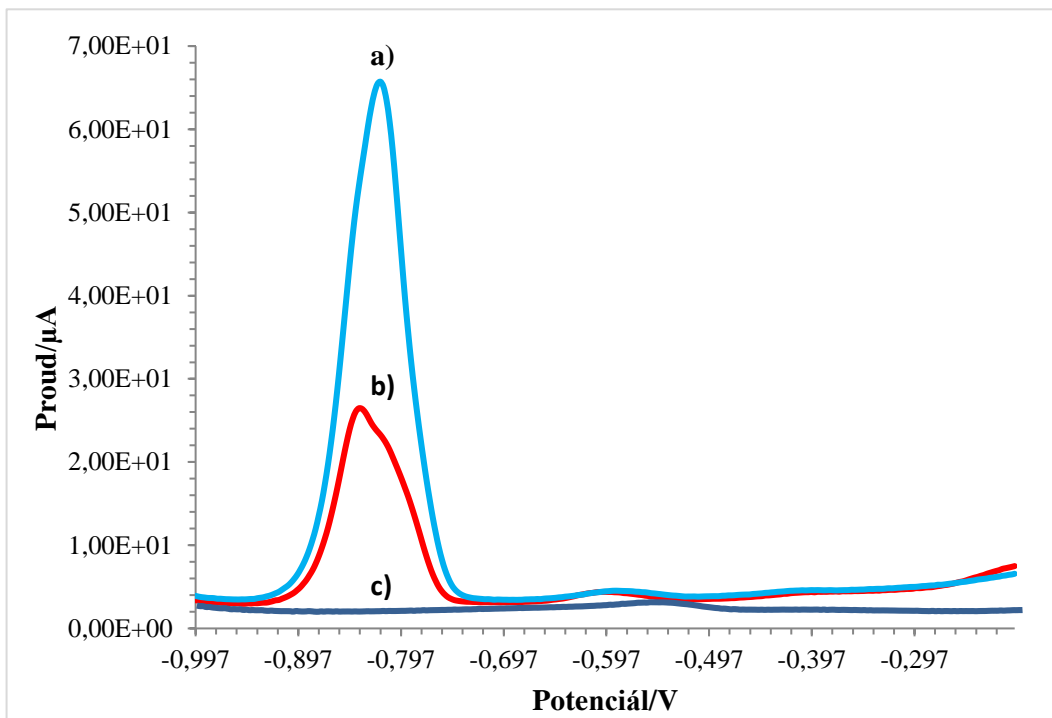
*Tabulka 9: Výsledky elektrochemické analýzy ředěné plodové vody*

Ředění plodové vody	Výsledky	
	Negativní vzorek	Pozitivní vzorek
Bez ředění	24,299 $\mu\text{A}$	45,455 $\mu\text{A}$
Ředění 1:1	23,417 $\mu\text{A}$	62,247 $\mu\text{A}$
Ředění 1:4	22,124 $\mu\text{A}$	38,757 $\mu\text{A}$

Získané výsledky jsou zobrazeny v tabulce 9. Lze pozorovat získané signály pozitivních a negativních vzorků při daném ředění plodové vody. Pro analýzu vzorků je důležité, aby rozdíl mezi signálem pozitivního a negativního vzorku byl co největší. Tuto podmínku splňuje v tomto případě ředění plodové vody 1:1. Rozdíl mezi pozitivním a negativním vzorkem plodové vody bez ředění, ředěné 1:1 a 1:4 je zobrazen na obrázcích 33, 34 a 35.

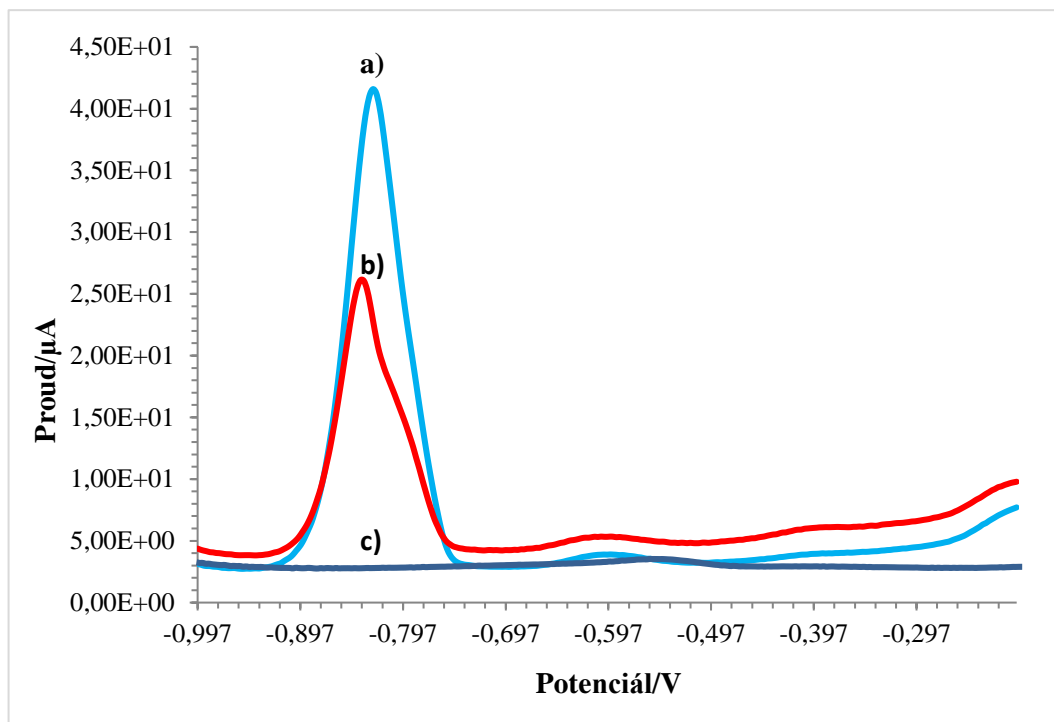


**Obrázek 33:** Voltamogram analýzy plodové vody bez ředění – pozitivní a negativní vzorky  
**a)** pozitivní vzorek plodové vody neředěný, **b)** negativní vzorek plodové vody neředěný,  
**c)** PBS pufr



**Obrázek 34:** Voltamogram analýzy plodové vody ředěné 1:1 – pozitivní a negativní vzorky  
**a)** pozitivní vzorek plodové vody ředěný 1:1, **b)** negativní vzorek plodové vody ředěný  
1:1, **c)** PBS pufr





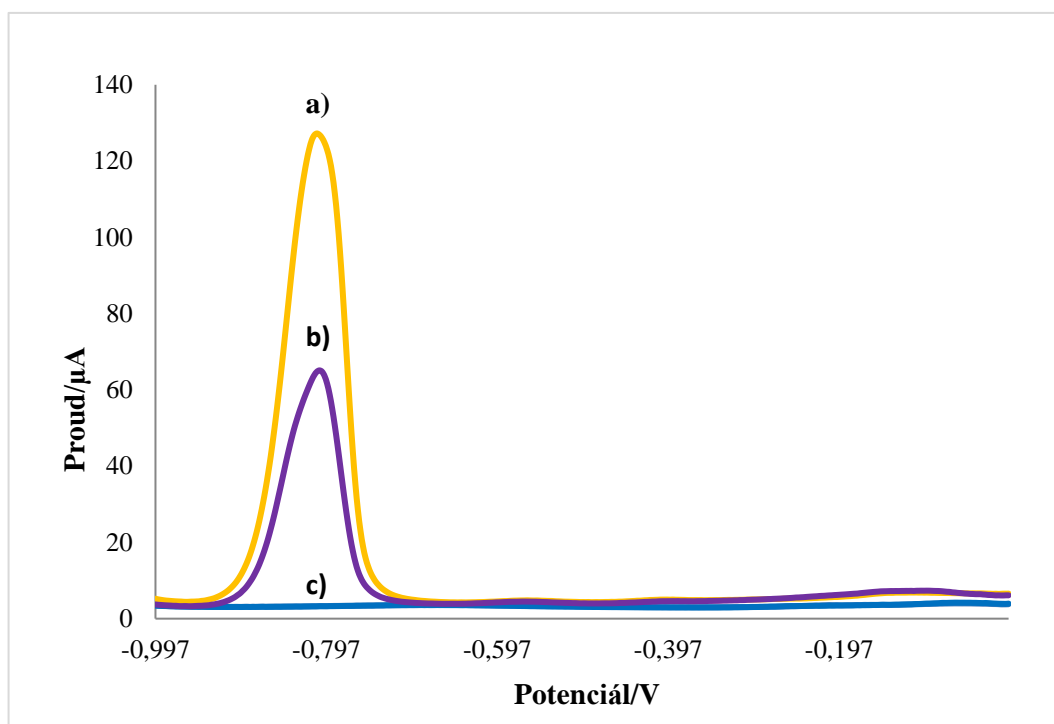
**Obrázek 35:** Voltamogram analýzy ředěné plodové vody 1:4 – pozitivní a negativní vzorky

- a)** pozitivní vzorek plodové vody ředěný 1:4, **b)** negativní vzorek plodové vody ředěný 1:4,  
**c)** PBS pufr

Negativní vzorek neředěné plodové vody vykazuje přibližně o polovinu nižší signál než pozitivní vzorek neředěné plodové vody, což je zřejmé i na obrázku 33. Negativní vzorek ředěné plodové vody 1:1 vykazuje přibližně o třetinu nižší signál než pozitivní vzorek ředěné plodové vody 1:1, což je zřejmé i na obrázku 34. Negativní vzorek ředěné plodové vody 1:4 vykazuje o méně než polovinu nižší signál než pozitivní vzorek ředěné plodové vody 1:4. Tyto výsledky dokazují, že pro elektrochemickou analýzu plodové vody je vhodné použití ředění 1:1, které poskytuje vysoký rozdíl mezi pozitivními a negativními vzorky. Pořádilo se získat informaci o vhodném ředění plodové vody pro analýzu, ale bylo nutné také prokázání vhodného pufru pro toto ředění.

#### 4.4.2 Vhodný pufr pro ředění plodové vody

Vhodný pufr pro ředění plodové vody se zjistil experimentem s ředěnými negativními vzorky plodové vody danými pufrů. Tyto vzorky byly inkubovány s imunisorbentem, biokonjugátem a následně elektrochemicky stanovovány. Po hydrolýze HCl byl supernatant nad magnetickými částicemi dávkován na tištěnou elektrodu ekvilibrovanou PBS a elektrochemicky změřen pomocí potenciostatu PalmSens2 spojeným se software PSTrace. Získaný výsledek je zobrazen na obrázku 36.



**Obrázek 36:** Voltamogram analýzy negativních vzorků plodové vody ředěných 1:4 v pufru PBS a TBT

**a)** negativní vzorek plodové vody ředěný 1:4 PBS pufrém, **b)** negativní vzorek plodové vody ředěný 1:4 TBT pufrém, **c)** PBS pufr

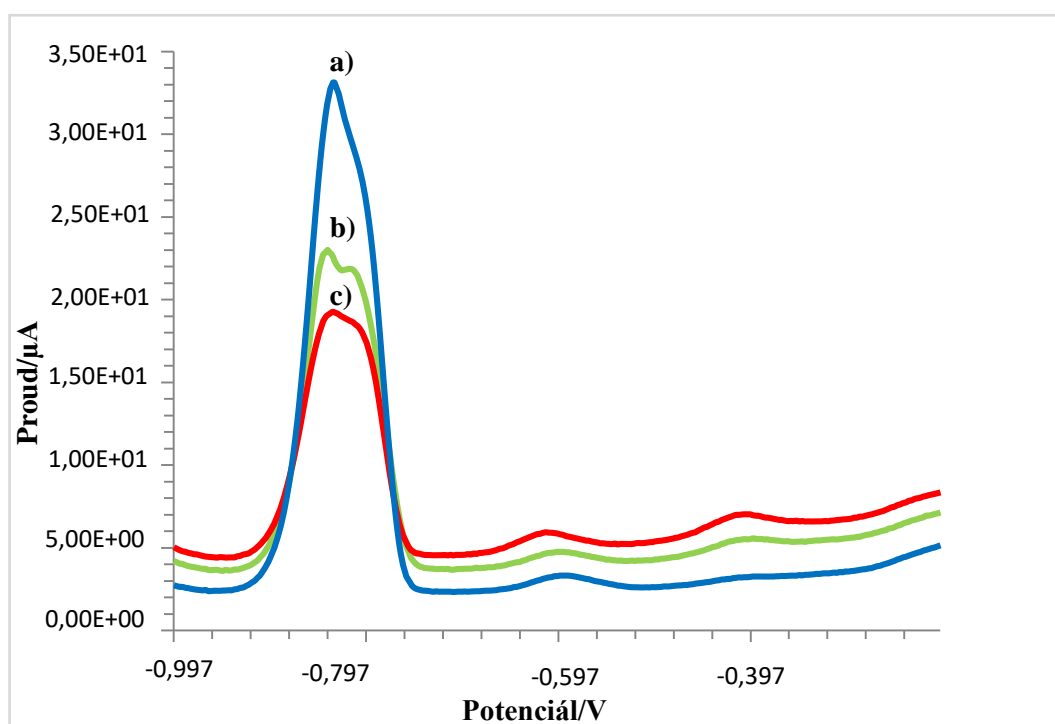
Z obrázku 36 je zřejmé, že negativní vzorek ředěné plodové vody pufrém PBS poskytuje vysoký signál i přes její negativitu. Negativní vzorek plodové vody ředěný pufrém TBT naopak vykazuje přibližně o polovinu nižší signál než pufr PBS. Pufr TBT je tedy vhodnější pro ředění plodové vody s její následnou elektrochemickou analýzou.

#### 4.4.3 Průkaz pentraxinu 3 v plodové vodě

Nejdůležitější parametry pro práci s plodovou vodou byly zjištěny, proto následoval experiment průkazu PTX3 z plodové vody pro ověření funkčnosti imunosorbentu specificky vychytávat tento biomarker z plodové vody. Experiment byl proveden s negativními vzorky plodové vody ředěné 1:1, které byly spikované rekombinantním PTX3 v koncentraci 5, 10 a 20 ng/ml. Tyto vzorky plodové vody byly inkubovány s imunosorbentem, biokonjugátem a následně elektrochemicky stanovovány. Po hydrolýze HCl byl supernatant nad magnetickými částicemi dávkován na tištěnou elektrodu ekvilibrovanou PBS a elektrochemicky změřen pomocí potenciostatu PalmSens2 spojeným se software PStace. Získané signály jednotlivých koncentrací PTX3 jsou zobrazeny v tabulce 10 a na obrázku 37.

**Tabulka 10:** Výsledky elektrochemické analýzy spikované negativní plodové vody ředěné 1:1

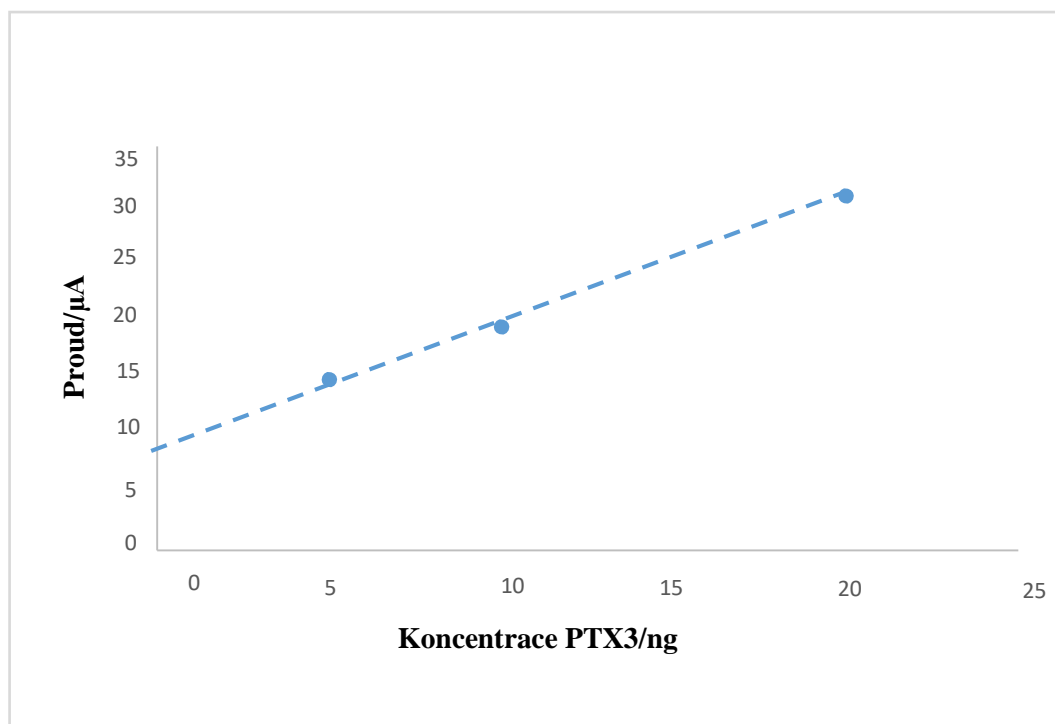
Koncentrace PTX3 (ng/ml)	Proud ( $\mu\text{a}$ )
5	14,787
10	19,336
20	30,698



**Obrázek 37:** Voltamogram analýzy spikované negativní plodové vody ředěné 1:1

- a) negativní vzorek spikovaný 20 ng/ml PTX3, b) negativní vzorek spikovaný 10 ng/ml PTX3,  
c) negativní vzorek spikovaný 5 ng/ml PTX3

Již z tabulky 10 je možné posoudit, že výsledný proud je úměrný množství PTX3 ve spikovaném vzorku ředěné plodové vody, což dokazuje i obrázek 37. Z těchto výsledků vyplývá, že nejvyšší signál správně poskytuje negativní plodová voda spikovaná 20 ng/ml PTX3 a nejnižší signál poskytuje negativní plodová voda spikovaná 5 ng/ml PTX3. Lineární rozsah PTX3 ve stanovovaných vzorcích je zobrazen na obrázku 38.



**Obrázek 38:** Lineární rozsah elektrochemické analýzy negativního vzorku plodové vody spikovaného PTX3 (5, 10 a 20 ng/ml)

Výsledek lineárního rozsahu na obrázku 38 potvrzuje, že signál získaný elektrochemickou analýzou spikované plodové vody je úměrný množství PTX3. Tímto experimentem se prokázala účinnost a funkčnost nejen připraveného imunosorbentu pro PTX3, ale i bio-konjugátu a celého senzoru pro průkaz PTX3 z plodové vody. Tyto výsledky potvrzují, že při dodržení optimálních podmínek pro elektrochemickou analýzu poskytuje senzor spolehlivé výsledky.

## 5 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo připravit vhodný nosič vychytávající biomarker PTX3 ze složité biologické matrice – plodové vody. Tento imunosorbent byl součástí nově vyvíjeného multiplexního senzoru s elektrochemickou detekcí, který má simultánně stanovovat 3 biomarkery – IL-6, PTX3 a kalretikulin – z plodové vody.

Pro tvorbu imunosorbentu bylo důležité nejen zjištění vhodného typu magnetických částic, ale k tomu odpovídající způsob vazby specifických anti-PTX3 IgG protilátek na tyto magnetické částice. Magnetické částice s proteinem A mohou být použity k tvorbě imunosorbentu pro PTX3, vykazují však nižší účinnost vazby protilátek než magnetické částice s karboxylovými funkčními skupinami. Z tohoto důvodu byly pro přípravu imunosorbentu na základě výsledků experimentů vybrány magnetické částice Dynabeads-COOH, které vykazovaly ze všech použitých vazeb nejvyšší účinnost vazby protilátek. Kovalentní vazba tvořená karboxylovými funkčními skupinami magnetických částic s NH<sub>2</sub> funkčními skupinami specifických protilátek zajišťovala účinnost a funkčnost celého imunosorbentu. Přestože se jedná o neorientovanou vazbu protilátek na magnetické částice, experimenty potvrdily vysokou účinnost tohoto použitého imunosorbentu.

Experimenty s plodovou vodou bylo zjištěno, že pro elektrochemickou analýzu plodové vody je optimální její ředění 1:1, a to TBT pufrem. Zároveň byla prokázána funkčnost imunosorbentu z magnetických částic Dynabeads-COOH v plodové vodě. Bylo prokázáno, že takto připravený imunosorbent splňuje požadované parametry, aby mohl být funkční součástí senzoru pro průkaz PTX3 ve vzorcích plodové vody. Zároveň se prokázala schopnost senzoru s elektrochemickou detekcí měřit signál úměrný množství PTX3 ve vzorcích plodové vody v lineárním rozsahu.

## 6 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] Romero, R., Espinoza, J. a další. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 11: 317-326, 2006, doi:10.1016/j.siny.2006.05.001.
- [2] Gomez-Lopez, N., a další. Immune cells in term and preterm labor. *Cellular & Molecular Immunology*. 11: 571–581, 2014, doi:10.1038/cmi.2014.46.
- [3] Kacerovský, M. a Musilová, I. Management předčasného odtoku plodové vody s ohledem na zánětlivé komplikace - naše zkušenosti. *Česká gynekologie*. 78(6): 509-513, 2013.
- [4] Theis, K. R., a další. Microbial burden and inflammasome activation in amniotic fluid of patients with preterm prelabor rupture of membranes. *Journal of Perinatal Medicine*. 48(2): 115–131, 2020, doi:10.1515/jpm-2019-0398.
- [5] Clark, G. F. a Schust, D. J. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. *Frontiers in Immunology*. 4(26): 1-14, 2013, doi:10.3389/fimmu.2013.00026.
- [6] Dutta, S. a Sengupta, P. Defining pregnancy phases with cytokine shift. *Journal of Pregnancy and Reproduction*. 1(4): 1-3, 2017, doi:10.15761/JPR.1000124.
- [7] Huang, Hong-Yuan. The Cytokine Network during Embryo Implantation. *Chang Gung Medical Journal*. 29(1): 25-36, 2006, PMID: 16642726.
- [8] Kumar, Rani. Textbook of Human Embryology. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd. Kapitola 6: 38-47, 2008, ISBN 978-81-906757-1-0.
- [9] Hsu, P. a Nanan, R. K. H. Innate and adaptive immune interactions at the fetal–maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. *Frontiers in Immunology*. 5(125): 1-12, 2014, doi:10.3389/fimmu.2014.00125.
- [10] Holt, P. G. a Jones, C. A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Division of Cell Biology*. 55: 688-697, 2000, doi:10.1034/j.1398-9995.2000.00118.x.
- [11] Mocková, Alice. Ovlivnění vývoje imunity v prenatálním a perinatálním období. *Pediatric pro praxi*. 15(4): 197–200, 2014.
- [12] Park, J. E., a další. Prenatal development of human immunity. *Science*. 368: 600–603, 2020, doi:10.1126/science.aaz9330.

- [13] Goenka, A. a Kollman, T. R. Development of immunity in early life. *Journal of Infection*. 71(1): S112-S120, 2015, doi:10.1016/j.jinf.2015.04.027.
- [14] Musumeci, G., a další. Pregnancy, embryo-fetal development and nutrition: physiology around fetal programming. *Journal of Histology and Histopathology*. 2(1): 1-6, 2015, doi:10.7243/2055-091X-2-1.
- [15] Gupta, P. D. a Tyagi, S. Development of immune system from newborn to adult: a new insight. *Journal of Cell and Tissue Research*. 20(1): 6853-6860 , 2020, ISSN: 0973-0028.
- [16] Ilancheran, S., Moodley, Y. a Manuelpillai, U. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? *Placenta*. 30(1): 2-10, 2009, doi:10.1016/j.placenta.2008.09.009.
- [17] Padron, G. Justin, Saito Reis, A. Chelsea a Kendall-Wright, E. Claire. The Role of Danger Associated Molecular Patterns in Human Fetal Membrane Weakening. *Frontiers in Physiology*. [Online] 2020. doi:10.3389/fphys.2020.00602.
- [18] Underwood, A. M., Gilbert, M. W. a Sherman, P. M. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *Journal of Perinatology*. 25: 341–348, 2005, doi:10.1038/sj.jp.7211290.
- [19] Harman, Christopher R. Amniotic Fluid Abnormalities. *Seminars in Perinatology*. 32: 288-294, 2008, doi:10.1053/j.semperi.2008.04.012.
- [20] Cruz-Lemini, M., a další. How to perform an amniocentesis. *Ultrasound Obstetrics Gynecology*. 44: 727–731, 2014, doi:10.1002/uog.14680.
- [21] Cho, Chan-Kyung J., a další. Proteomics Analysis of Human Amniotic Fluid. *Molecular & Cellular Proteomics*. 6(8): 1406 –1415, 2007, doi:10.1074/mcp.M700090-MCP200.
- [22] Underwood, M. A. a Sherman, M. P. Nutritional Characteristics of Amniotic Fluid. *Neoreviews*. 7(6): e310-e316, 2006, doi:10.1542/neo.7-6-e310.
- [23] You, Q., a další. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 103: 149–152, 2008, doi:10.1016/j.ijgo.2008.06.012.
- [24] Gomez-Lopez, N., a další. The immunophenotype of amniotic fluid leukocytes in normal and complicated pregnancies. *American Journal of Reproductive Immunology*. 79(4): 1-17, 2018, doi:10.1111/aji.12827.

- [25] Aher, S., Malwatkar, K. a Kadam, S. Neonatal anemia. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 13: 239-247, 2008, doi:10.1016/j.siny.2008.02.009.
- [26] Combs, C. A., a další. Amniotic fluid infection, inflammation, and colonization in preterm labor with intact membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 210: 125.e1-15, 2014, doi:10.1016/j.ajog.2013.11.032.
- [27] Menon, R. a Richardson, L. S. Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. *Seminars in Perinatology*. 41(7): 409 – 419, 2017, doi:10.1053/j.semperi.2017.07.012.
- [28] Musilová, I., a další. Late preterm prelabor rupture of fetal membranes: fetal inflammatory response and neonatal outcome. *International Pediatric Research Foundation*. Hradec Králové : Pediatric Research, 2018. Sv. 83(3): 630-637. doi:10.1038/pr.2017.300.
- [29] Medina, T. M. a Hill, D. A. Preterm Premature Rupture of Membranes: Diagnosis and Management. *American Family Physician*. 73(4): 659-664, 2006, PMID: 16506709.
- [30] Caughey, A. B., Robinson, J. N. a Norwitz, E. R. Contemporary Diagnosis and Management of Preterm Premature Rupture of Membranes. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*. 1(1): 11-22, 2008, PMID: 18701929.
- [31] Challis, J. R., a další. Inflammation and Pregnancy. *Reproductive Sciences*. 16(2): 206-215, 2009, doi:10.1177/1933719108329095.
- [32] Mor, G., a další. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1221(1): 80–87, 2011, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x.
- [33] Cobo, T., a další. Predictive value of combined amniotic fluid proteomic biomarkers and interleukin-6 in preterm labor with intact membranes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 200(5): 499.e1-6, 2009, doi:10.1016/j.ajog.2008.12.036.
- [34] Uciechowski, P. a Dempke, W. C. M. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*. 2020, doi:10.1159/000505099 .
- [35] Ataie-Kachoie, P., a další. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *Journal of Clinical Pathology*. 67:932-937, 2014, doi:10.1136/jclinpath-2014-202493.
- [36] Tanaka, T., Ogata, A. a Narazaki, M. Tocilizumab: An Updated Review of Its Use in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Its Application for Other Immune-Mediated



Diseases. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics* . 5(5):33-52, 2013, doi:10.4137/CMT.S9282.

[37] Kang, S., a další. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *Journal of Experimental Medicine*. 217(5): 1-10, 2020, doi:10.1084/jem.20190347.

[38] Tanaka, T., Narazaki, M. a Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014, doi:10.1101/cshperspect.a016295.

[39] Weissenbacher, T., a další. Diagnostic biomarkers of pro-inflammatory immune-mediated preterm birth. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 287: 673–685, 2013, doi:10.1007/s00404-012-2629-3.

[40] Velez, D. R., a další. Ethnic differences in interleukin 6 (IL-6) and IL6 receptor genes in spontaneous preterm birth and effects on amniotic fluid protein levels. *Annals of Human Genetics*. 71: 586–600, 2007, doi:10.1111/j.1469-1809.2007.00352.x.

[41] Musilová, I., a další. Amniotic fluid calreticulin in pregnancies complicated by the preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2016, doi:10.3109/14767058.2016.1154940.

[42] Raghavan, M., a další. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends in Immunology*. 34(1): 13-21, 2013, doi:10.1016/j.it.2012.08.002.

[43] Uniprot. *Pentraxin-related protein PTX3*. [Online] UniprotKB. [Citace: 21. září 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/P26022>.

[44] Cruciani, L., a další. Pentraxin 3 in amniotic fluid: a novel association with intra-amniotic infection and inflammation. *Journal of Perinatal Medicine*. 38: 161–171, 2010, doi:10.1515/JPM.2009.141.

[45] Cieřlik, P. a Hrycek, A. Long pentraxin 3 (PTX3) in the light of its structure, mechanism of action and clinical implications. *Autoimmunity*. 45(2):119-128, 2011, doi:10.3109/08916934.2011.611549.

[46] Kacerovský, M., a další. Pentraxin 3 in amniotic fluid as a marker of intra-amniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 108: 203–206, 2010, doi:10.1016/j.ijgo.2009.10.018.

[47] Cruciani, L., a další. Pentraxin 3 in maternal circulation: An association with preterm labor and preterm PROM, but not with intra-amniotic infection/inflammation. *The Journal*

od *Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 23(10): 1097–1105, 2010, doi:10.3109/14767050903551509.

[48] McWilliam, S. a Riordan, A. How to use: C-reactive protein. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*. 95: 55–58, 2010, doi:10.1136/adc.2009.174367.

[49] Marchocki, Z., a další. Amniotic fluid C-reactive protein as a predictor of infection in caesarean section: a feasibility study. *Scientific Reports*. 8(1): 1-10, 2018, doi:10.1038/s41598-018-24569-8.

[50] Musilová, I., a další. Amniotic fluid pentraxins: Potential early markers for identifying intra-amniotic inflammatory complications in preterm pre-labor rupture of membranes. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018, doi:10.1111/aji.12789.

[51] MacLeod, C. M. a Avery, O. T. The Occurrence During Acute Infections of a Protein not Normally Present in the Blood. *Journal of Experimental Medicine*. 73(2): 191-200, 1941, doi: 10.1084/jem.73.2.191.

[52] Ren, M., a další. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *The EMBO Journal*. 29(23): 3952–3966, 2010, doi:10.1038/emboj.2010.256.

[53] Bhavsar, I., Millwe, C. S. a Al-Sabbagh, M. Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha (MIP-1 alpha)/CCL3: As a Biomarker. *General Methods in Biomarker Research and Their Applications*. Kapitola 9, 2015, doi:10.1007/978-94-007-7696-8\_27.

[54] Souček, O., a další. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in amniotic and cervical fluids in spontaneous preterm labor with intact membranes with respect to intra-amniotic inflammation. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2021, doi:10.1080/14767058.2021.1922381.

[55] Dulay, A. T., a další. Soluble TLR2 Is Present in Human Amniotic Fluid and Modulates the Intraamniotic Inflammatory Response to Infection. *The Journal of Immunology*. 182: 7244 –7253, 2009, doi:10.4049/jimmunol.0803517.

[56] Andryś, C., a další. Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 26(5): 520–527, 2012, doi: 10.3109/14767058.2012.741634.

[57] Gao, S., a další. Cathepsin G and Its Role in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Archives of Rheumatology*. 33(4):498-504, 2018, doi:10.5606/ArchRheumatol.2018.6595.

- [58] Zamolodchikova, T. S., Tolpygo, S. M. a Svirshchevskaya, E. V. Cathepsin G—Not Only Inflammation: The Immune Protease Can Regulate Normal Physiological Processes. *Frontiers in Immunology*. 11(411): 1-5, 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.00411.
- [59] Musilová, I., a další. Amniotic fluid cathepsin-G in pregnancies complicated by the preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2016, doi:10.1080/14767058.2016.1237499.
- [60] Lint, P. V. a Libert, C. Matrix metalloproteinase-8: Cleavage can be decisive. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 17: 217–223, 2006, doi:10.1016/j.cytogfr.2006.04.001.
- [61] Park, CH.-W., a další. The frequency and clinical significance of intra-amniotic inflammation defined as an elevated amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 in patients with preterm labor and low amniotic fluid white blood cell counts. *Obstetrics & Gynecology Science*. 56(3): 167-175, 2013, doi:10.5468/ogs.2013.56.3.167.
- [62] Agier, J., Efenberger, M. a Brzezińska-Błaszczuk, E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Central European Journal of Immunology*. 40 (2): 225-235, 2015, doi:10.5114/ceji.2015.51359.
- [63] Myntti, T., a další. Comparison of amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 and cathelicidin in the diagnosis of intra-amniotic infection. *Journal of Perinatology*. 36, 1049–1054, 2016, doi:10.1038/jp.2016.147.
- [64] Van der Veen, B. S., de Winther, M. P. J. a Heeringa, P. Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11(11): 2899-2937, 2009, doi:10.1089=ars.2009.2538.
- [65] Kacerovský, M., a další. Amniotic fluid myeloperoxidase in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 26(5): 463–468, 2012, doi:10.3109/14767058.2012.735997.
- [66] Meniailo, M. E., a další. Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages. *International Immunopharmacology*. 56: 217–221, 2018, doi:10.1016/j.intimp.2018.01.036.
- [67] Yoneda, S., a další. Accurate Prediction of the Stage of Histological Chorioamnionitis before Delivery by Amniotic Fluid IL-8 Level. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2015, doi:10.1111/aji.12360.

- [68] Schmidt-Ott, K. M., a další. Dual Action of Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin. *Journal of the American Society of Nephrology*. 18(2): 407– 413, 2007, doi:10.1681/ASN.2006080882.
- [69] Vajrychová, M., a další. Microbial invasion and histological chorioamnionitis upregulate neutrophil-gelatinase associated lipocalin in preterm prelabor rupture of membranes. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 29(1): 12-21, 2014, doi:10.3109/14767058.2014.991305.
- [70] Poulsen, E. T., a další. Serum Amyloid P Component (SAP) Interactome in Human Plasma Containing Physiological Calcium Levels. *Biochemistry*. 56(6): 896–902, 2017, doi:10.1021/acs.biochem.6b01027.
- [71] Cox, N., Pilling, D. a Gomer, R. H. Serum amyloid P: a systemic regulator of the innate immune response. *Journal of Leukocyte Biology*. 96(5): 739-743, 2014, doi:10.1189/jlb.1MR0114-068R.
- [72] Møller, Holger J. Soluble CD163. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 72(1): 1-13, 2011, doi:10.3109/00365513.2011.626868.
- [73] Kacerovský, M., a další. Amniotic fluid concentrations of soluble scavenger receptor for hemoglobin (sCD163) in pregnancy complicated by preterm premature rupture of the membranes and histologic chorioamnionitis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 24(8): 995-1001, 2010, doi:10.3109/14767058.2010.538453.
- [74] McCartney, S. A., a další. Amniotic fluid interleukin 6 and interleukin 8 are superior predictors of fetal lung injury compared with maternal or fetal plasma cytokines or placental histopathology in a nonhuman primate model. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 225: 89.e1-16, 2021, doi:10.1016/j.ajog.2020.12.1214.
- [75] Romero, R., a další. Prevalence and Clinical Significance of Sterile Intra-amniotic Inflammation in Patients with Preterm Labor and Intact Membranes. *American Journal of Reproductive Immunology*. 72: 458-474, 2014, doi:10.1111/aji.12296.
- [76] Nadeau-Vallée, M., a další. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Society for Reproduction and Fertility*. 152(6): R277–R292, 2016, doi: 10.1530/REP-16-0453.

- [77] ThermoFisher Scientific. *ELISA Enzyme Substrates*. [Online] ThermoFisher Scientific. [Citace: 22. září 2021.] <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/antibodies/immunoassays/elisa-kits/elisa-enzyme-substrates.html>.
- [78] Houser, Brett. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. *Archives of Physiology And Biochemistry*. 118(4): 192-196, 2012, doi: 10.3109/13813455.2012.705301.
- [79] Luppa, P. B., a další. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *Trends in Analytical Chemistry*. 30(6): 887-898, 2011, doi: 10.1016/j.trac.2011.01.019.
- [80] Gubala, V., a další. Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chemistry*. 84(2): 487-515, 2011, doi: 10.1021/ac2030199.
- [81] Cho, I-H., a další. Current Technologies of Electrochemical Immunosensors: Perspective on Signal Amplification. *Sensors*. 18(1), 2018, doi: 10.3390/s18010207.
- [82] Niemirowicz, K., a další. Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine. *Advances in Medical Sciences*. 57(2): 196-207, 2012, doi: 10.2478/v10039-012-0031-9.
- [83] Vigneshwaran, M., Bhaskara, V. C. a Rusling, J. F. Magnetic particles in ultrasensitive biomarker protein measurements for cancer detection and monitoring. *Expert Opin Med Diagn*. 5(5): 381-391, 2011, doi: 10.1517/17530059.2011.607161.
- [84] Anderson, S. D., Gwenin, V. V. a Gwenin, C. D. Magnetic Functionalized Nanoparticles for Biomedical, Drug Delivery and Imaging Applications. *Nanoscale Research Letters*. 14(188), 2019, doi: 10.1186/s11671-019-3019-6.
- [85] Jung, Y., Jeong, J. Y. a Chung, B. H. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. *The Royal Society of Chemistry*. 133: 697-701, 2008, doi: 10.1039/b800014j.
- [86] Nasirzadeh, K., Nazarian, S. a Hayat, S. M. G. Inorganic Nanomaterials: A Brief Overview of the Applications and Developments in Sensing and Drug Delivery. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 3(2): 395-402, 2016.
- [87] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques, 2nd Edition*. London : Academic Press, 2008. ISBN: 978-0-12-370501-3.
- [88] Vacek, J. a Ostatná, V. *Bioelektrochemie*. 2020, ISBN 978-80-244-5764-2.

[89] Mincu, N.-B., a další. Screen-Printed Electrodes (SPE) for In Vitro Diagnostic Purpose. *Diagnostics*. 10(8), 2020, doi: 10.3390/diagnostics10080517.

[90] Bílková, Z. a Korecká, L. Multiplexní imunosenzor pro kvantifikaci biomarkerů zánětu asociovaných s rizikem předčasného porodu. *Kontrolní den rady pro komercializaci, 1. října 2020*. Pardubice, 2020.