

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Nikola Leyerová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Laboratorní důkaz těhotenství v nízkém týdnu  
Bakalářská práce

2023

Nikola Leyerová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikola Leyerová**  
Osobní číslo: **C19257**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Laboratorní důkaz těhotenství v nízkém týdnu**  
Téma práce anglicky: **Laboratory Evidence Of Pregnancy In A Low Week**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma laboratorního důkazu těhotenství v nízkém týdnu těhotenství
  - a. Současný stav poznání
  - b. Používané metody
  - c. Trendy do budoucna

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**  
Herbacos Recordati s.r.o.

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 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

Prohlašuji:

Práci s názvem Laboratorní důkaz těhotenství v nízkém týdnu jsem 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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

Nikola Leyerová

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Vojtěchu Vejvodě, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích.

## **ANOTACE**

Práce je věnována náhledu průběhu otěhotnění a těhotenství, obsahuje kapitulu charakterizující lidský choriový gonadotropin a důvod jeho využití jako těhotenský marker. Hlavní téma mé práce je zaměřeno na diagnostické těhotenské testy – DOMACÍ i LABOARTORNÍ, jejich citlivost, dobu od početí, kdy je možné použití a očekávat validní výsledek. V závěru práce pojednávám o diagnostických trendech do budoucna.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Těhotenství, lidský choriový gonadotropin, těhotenské testy, historie těhotenských testů, budoucnost těhotenských testů

## **TITLE**

Laboratory evidence of pregnancy in low week

## **ANNOTATION**

The work is devoted to an overview of the course of conception and pregnancy, it contains a chapter characterizing human chorionic gonadotropin and the reason for it is use as a pregnancy marker. The main topic of my work is focused on diagnostic pregnancy tests – HOME and LABORATORY, their sensitivity, the period from conception when it is possible to use them and expect a valid result. At the end of the thesis, I discuss diagnostic trends for the future.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Pregnancy, human chorionic gonadotropin, pregnancy tests, history of pregnancy tests, future of pregnancy tests

## OBSAH

OBSAH .....	2
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	4
SEZNAM TABULEK.....	5
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	6
ÚVOD .....	7
1. TĚHOTENSTVÍ.....	9
1.1. Fyziologie těhotenství .....	9
1.2. Průběh vývoje oplozeného vajíčka.....	10
1.3. Placenta .....	12
1.3.1. Funkce placenty.....	13
1.4. Měsíční vývoj plodu.....	14
2. LIDSKÝ CHORIOVÝ GONADOTROPIN .....	15
2.1. Historie .....	18
2.2. Struktura hCG.....	18
2.3. Patologická produkce hCG.....	20
2.4. Gestační trofoblastická nemoc (GTN) .....	20
Germinativní tumory varlete .....	21
3. HISTORICKÉ METODY STANOVENÍ TĚHOTENSTVÍ.....	22
4. TESTY PRO SAMOVYŠETŘENÍ.....	25
4.1.1. Imunochromatografické „screeningové“ testy .....	26
4.1.1.1. Test pro kvalitativní detekci hCG .....	27
4.1.2. Domácí testovací sada ze vzorku moči .....	29
4.2. Test pro kvalitativní detekci lidského hCG ze vzorku krve .....	30
4.2.1. Domácí testovací sada ze vzorku krve .....	30



4.2.2.	Falešně negativní těhotenský test: Hook Efekt .....	31
5.	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA.....	33
5.1.	Intaktní lidský chodirogonadotropin v séru pomocí ECL .....	33
5.1.1.	Elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy hCG pomocí stříbrných uhlíkových kvantových teček a funkcionalizovaných polymerních nanosfér.....	34
5.2.	Elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy hCG pomocí sendvičového imunosenzoru s CDs@dSiO <sub>2</sub> nanočásticemi.....	36
6.	MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY .....	41
7.	ZÁVĚR.....	42
8.	CITOVANÁ LITERATURA .....	44

# SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1 VÝVOJE VAJÍČKA A NÁSLEDNÝ PRŮBĚH OPLOZENÉHO VAJÍČKA OD SPOJENÍ POHLAVNÍCH BUNĚK AŽ K UHNÍZDĚNÍ BLASTOCYTY .....	10
OBRÁZEK 2 VYOBRAZENÍ TŘÍ TÝDENNÍHO VÝVOJE VAJÍČKA .....	12
OBRÁZEK 3 SCHEMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ PROTEINOVÉ PRIMÁRNÍ STRUKTURY A A B PODJEDNOTEK GONADOTROPINŮ+ POČET AMINOKYSELIN JEDNOTLIVÝCH PODJEDNOTEK.....	15
OBRÁZEK 4 ZNÁZORNĚNÍ STRUKTURY SYNCYTIOTROBLASTU (ZDROJ PRODUKCE hCG) A PRIMÁRNÍCH KLKŮ ZANOŘUJÍCÍCH SE DO EMBRYA, NÁSLEDUJE VÝVOJ SEKUNDÁRNÍCH A TERCÍÁLNÍCH KLKŮ. Z SYNCYTIOTROBLASTU TORFOBLASTU A MATEŘSKÉHO ENDOMETRIA NAKONEC VZNIKÁ PLACENTA.....	16
OBRÁZEK 5 DENNÍ ZVÝŠENÍ hCG V MOČI V ČASNÉM TĚHOTENSTVÍ VE TŘECH RŮZNÝCH STUDIIÍCH: THE UK EARLY PREGNANCY STUDY, UK STANDARD CARE ULTRASOUND STUDY A US GESTATION AGE STUDY (C. GNOTH, 2014) .....	17
OBRÁZEK 6 ČASOVÁ OSA VÝVOJE TĚHOTENSKÝCH TESTŮ .....	22
OBRÁZEK 7 SCHÉMA ČASNÉHO TĚHOTENSKÉHO TESTU NA BÁZI PROTILÁTEK.....	25
OBRÁZEK 8 SCHÉMA SENDVIČOVÉHO USPOŘÁDÁNÍ IMUNOCHROMATOGRAFICKÝCH TESTŮ VML.....	28
OBRÁZEK 9 VNITŘNÍ STRUKTURA CLEARBLUE TĚHOTENSKÉHO TESTU + TÝDENNÍ VYHODNOCENÍ (43).....	30
OBRÁZEK 10 NALEVO: FUNKČNÍ TĚHOTENSKÝ TEST. NAPRAVO: TEST PODLÉHAJÍCÍ HOOK EFEKTU – FALŠNĚ NEGATIVNÍ VYHODNOCENÍ TESTU.....	32
OBRÁZEK 11 PRINCIP ECL S UTRASENZITIVNÍM IMUNOSENZOREM AGCQDs@PNS-PEI.....	34
OBRÁZEK 13 SROVNÁNÍ METOD PRO DETEKCI hCG (POŽITO Z PŮVODNÍ STUDIE (38)).....	36
OBRÁZEK 13 PRINCIP ECL POMOCÍ SENDVIČOVÉHO IMUNOSENZORU S CDs@dSIO2 NANOČÁSTICEMI.....	36

## SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 DĚLENÍ GTN PODLE ÚROVNĚ ZHOUBNOSTI ONEMOCNĚNÍ (27) .....	20
TABULKA 2 DĚLENÍ GTN DLE SKUPINY RIZIKA (27).....	21
TABULKA 3 CLEARBLUE TĚHOTENSKÝ TEST – PRÁH PRO STANOVENÍ VÝSLEDKŮ .....	29
TABULKA 4 DOMÁCÍ KREVNÍ TEST – VÝHODY A NEVÝHODY .....	31
TABULKA 5 VÝSLEDKY STUDIE O DETEKCI HCG POMOCÍ ELC MAGNETICKÉ IMUNOANALÝZY V NEMOCNICI (POUŽITO Z PŮVODNÍ STUDIE (53)) .....	35
TABULKA 6 VÝSLEDKY ANALÝZY DETEKCE HCG POMOCÍ ECL S CDs@dSiO <sub>2</sub> NANOČÁSTICEMI (57).....	39
TABULKA 7 POROVNÁNÍ DIAGNOSTICKÝCH METOD PRO DETEKCI HCG (54).....	40

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AMC – odběr plodové vody

AMK – aminokyselina

CTP – C-koncový peptid

CVS – odběr choriových klků

ECL – elektrochemiluminiscence

FDA – Americký úřad pro potraviny a léčiva

FSH – folikulostimulační hormon

GTN – gestační trofoblastická nemoc

hCG – lidský choriový gonadotropin

hCG-h – hyperglykosylovaný lidský choriový gonadotropin

Hg – hemoglobin

LH – Luteinizační hormon

NGF – neuronální růstový faktor

PDGF –  $\beta$  – podjednotka  $\beta$  růstového faktoru krevních destiček

TGF- $\beta$  – z angl. transforming growth factor  $\beta$

TSH – tyreotropní hormon

# ÚVOD

Těhotenství je začátkem nového života, který zásadním způsobem ovlivňuje život rodičů. Některé páry těhotenství plánují a snaha o početí je mnohdy spojena se sledováním celého periodického cyklu, se zaměřením na ovulační fázi, zatímco jiné páry o ovulačních dnech v daný moment nemají ponětí a jejich snaha není nutně spojená s početím, i přesto obě skupiny dosahují stejných výsledků – otěhotnění. Poté na řadu přicházejí těhotenské testy, kdy cíl diagnostiky hraje důležitou roli pro potvrzení gravidity, odhalení mnohočetnosti i patologie. Neboť těhotenství s sebou nemusí nést jen radost, ale může být i zdrojem obav o zdraví rodičky a nenarozeného dítěte. V pozdější fázi těhotenství je diagnostika zaměřena na genetické predispozice, ale těmi se v této práci nezabývám.

V této práci bych se chtěla soustředit na metody, které těhotenství potvrzují. Moment, kdy žena zjišťuje „změnu svého stavu“ či sahá po testu, může být v období očekávané menstruační fáze (deskvamační) či během ní, kdy dochází z fyziologických procesů přirozených pro oplození k absenci menstruace. To naznačuje, že vynechaná menstruace patří mezi těhotenské příznaky a pro ženu to bývá indikační bod. Avšak i vynechání menstruace nemusí být pro ženu vždy hlavní signalizací, jelikož ztráta menstruace není v plodném věku ojedinělý případ, ale může být spojená s onemocněním fyzického i psychického rázu. U psychického důvodu se může jednat o poruchy příjmu potravy i depresivní a úzkostné poruchy. Naopak jsou známy i případy, kdy žena těhotná byla a menstruaci měla, důvody jsou však zatím neznámé. V případě, že se partneri o potomka snaží, touží po co možná nejdřívejším vyhodnocení výsledku jejich snahy a vyhledávají diagnostické metody s vysokou citlivostí a přesností. I na tyto požadavky a metody s nimi souvisejícími bude brát má práce zřetel a pokusím se, nastítnit jak by taková diagnostika mohla s dnešní úrovní poznání probíhat a jak by tomu mohlo případně být v blízké budoucnosti.

Hlavním sledovaným markerem při diagnostice těhotenství, ať už z pohodlí domova nebo při lékařské prohlídce i u diagnóz podléhajících odborné znalosti je lidský choriový gonadotropin, hormon ze skupiny glykoproteinových hormonů. Tento hormon je více popsán v kapitole LIDSKÝ CHORIOVÝ GONADOTROPIN, která je zaměřena na jeho

charakterizaci, strukturu i patologický význam. Vylučování hormonu je nastíněno v kapitole TĚHOTENSTVÍ.

Hlavní téma celé mé práce je věnováno pojednání o těhotenských testech, obsahem práce je historické nastínění vývoje těhotenských testů, metodika principů aktuální testů dostupných pro domácí použití a laboratorní diagnostiku a v neposlední řadě náhled do diagnostických trendů budoucna díky ECL a genetickým metodám.

# 1. TĚHOTENSTVÍ

Těhotenství je stav, jenž je v těle ženy spojen s velkým množstvím změn, respektive se změnami téměř všech orgánových struktur. Tyto změny vycházejí z adaptace organismus na vývoj a rozvoj plodu. Adaptační procesy stimulované těhotenstvím jsou reverzibilní, k návratu k fyziologickému stavu dochází několik měsíců po porodu, eventuálně po ukončení laktace. Tyto změny nám mohou sloužit, jako jasné ukazatele těhotenství, jež lze použít při domácím či laboratorním vyhodnocení gravidity.

Průměrná doba trvání těhotenství je 270–284 dní, 40–42 týdnů (1), které se dělí do tří trimestrů, dle vývojových procesů, které jsou vždy charakteristické danému úseku gravidity. První trimestr je do 12. týdnu+6, druhý trimestr je ukončen v 27. týdnu+6 a třetí trimestr je od 28. týdnu až do termínu porodu. (2)

## 1.1. Fyziologie těhotenství

Gravidita je stav počínající oplozením vajíčka spermií, spojením ženských a mužských pohlavních buněk, a končící porodem plodu .

V průběhu menstruačního cyklu dozrává folikul obsahující vajíčko ve vaječnících, folikul během ovulace praská a vajíčko se přesouvá do vejcovodu, kde může dojít k splynutí vajíčka se spermií. Aby k tomuto splynutí došlo, musí se mužské pohlavní buňky po ejakulaci pohybovat přes počátek vagíny k děložnímu hrdlu přes dělohu až do vejcovodů. Schopnost plavat dává spermiím bičík, který je součástí těla spermie, a chemotaxe, což je pohyb na základě chemických podmětů. Akrozom, jenž překrývá hlavičku spermie je důležitý při průniku spermie do vajíčka. Po kontaktu s membránou vajíčka se aktivují proteolytické enzymy čepičky (hyaluronidázy, akrozinu – proteolytický enzym, neuromidázy), které napomáhají k rozpuštění ochranných vrstev vajíčka, následuje oddělení jádra od zbytku spermie a kontakt s jádrem vajíčka (3). Po splynutí obou pohlavních buněk vzniká diploidní **zygota**.

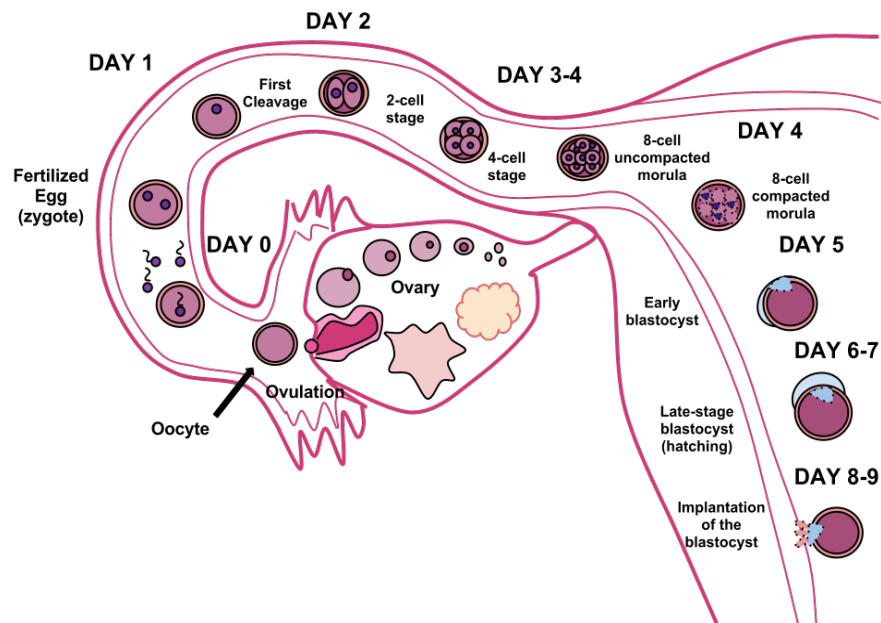
Spermie mají schopnost přežití v ženském těle obvykle 48 hodin, přičemž na oplození vajíčka mají 12 hodin, než dojde k vypuzení vajíčka z těla.

Splynutím se redukují chromozomy obou pohlavních buněk na polovinu, výsledkem je buňka s haploidním počtem chromozomů, ta obsahuje 23 chromozomů, které se skládají z 22 autozomů a 1 gonozomu. Otec předává svým potomkům chromozom buď X nebo chromozom Y: to o jaký předaný chromozom se bude jednat určí pohlaví nového jedince, pokud otec předá svému potomku chromozom Y, potomek bude pohlaví mužského XY, pokud mu předá chromozom X, potomek bude pohlaví ženského XX. (4)

## 1.2. Průběh vývoje oplozeného vajíčka

Zygota je před uhnížděním oplozeného vajíčka dělena mitotickým dělením a to v průběhu svého postupu vejcovodem do dělohy. Nejprve dochází rýhováním ke vzniku dvou buněk zvané blastomera a to přibližně za 20–30 hodin, během 40–50 hodin vznikají čtyři.

Dělení je ukončeno 4. den ve stadiu zvaném morula – při počtu 16 individuálních buněk, které jsou připravené na sestup do dělohy a uhníždění. Transport vajíčka do děložní dutiny probíhá pomocí rytmickým stahům vejcovodů, během transportu díky žloutkové výživně a sekretu uvolňovaným slizničními buňkami přibývá počet buněk ve vajíčku (zárodku).



Obrázek 1 Vývoje vajíčka a následný průběh oplozeného vajíčka od spojení pohlavních buněk až k uhníždění blastocytu



Cesta vejcovodem trvá 5-6 dní. Po reparativním dělení se v morule utvoří dutina, blastocysta (4. den po oplození). Její buňky se diferencují: *skupina excentricky nahromaděných buněk vnitřní vrstvy tvoří embryoblast, ten obklopuje jednovrstvá řada periferních buněk tvořící trofoblast.* (5)

- Embryoblast, vznik zárodku, žloutkového obalu a aminového váčku,
- Trofoblast, který je odpovědný za nidaci (uhnízdění) zárodku do děložní sliznice.

Mezi 6. a 7. den po oplození blastocysta podléhá nidaci – proniká do sliznice dělohy, tzv. uhnízdění, stranou, kde je embryoblast. (6)

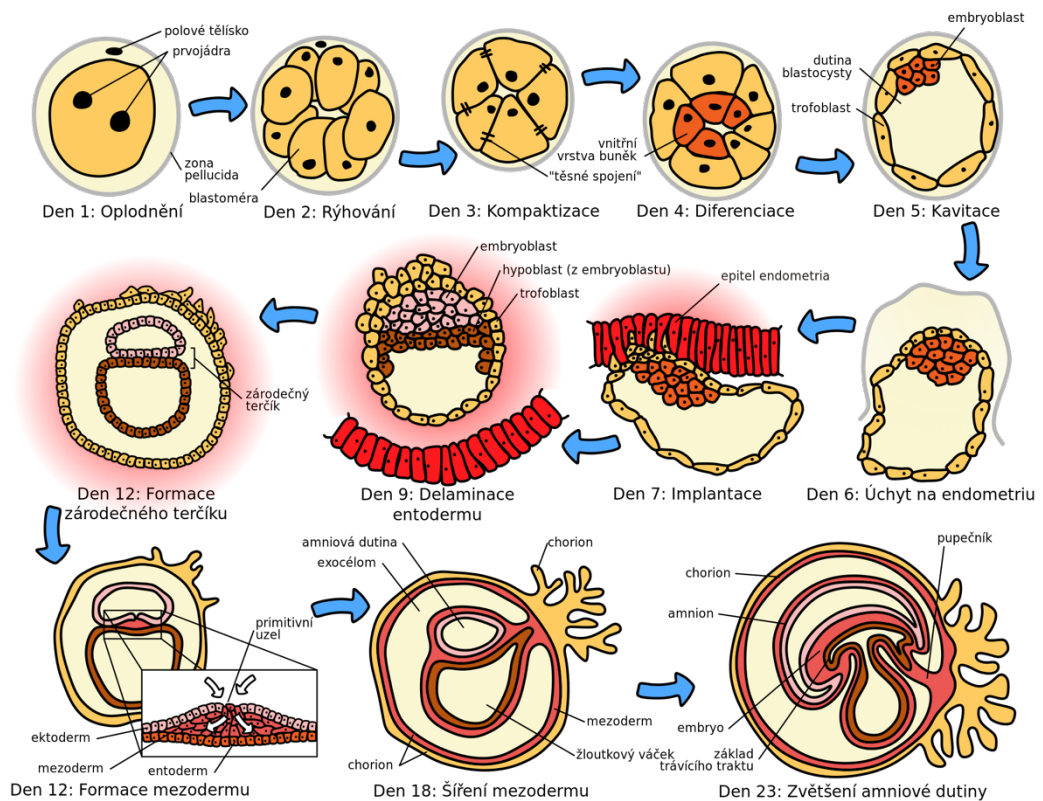
**Z buněk embryoblastu** je od 2. týdne vývoje patrný zárodeční terčik, ze kterého vznikají tři zárodeční listy – ektoderm, mezoderm, entoderm. Tyto tři vrstvy dávají zárodku základ pro všechny orgánovým soustavám. Nastává organogeneze. Na konci druhého měsíce má plod základy pro všechny orgánové struktury.

**Ektoderm** – vyformuje kůži, nehty, vlasy, rohovku, linii vnitřního a vnějšího ucha, nos, dutinu, ústa, konečník, zuby, hypofýzu, prsní žlázy, oči a všechny části nervového systému. (7)

**Mezoderm** – vyformuje svaly, kosti, lymfatickou tkáň, vnitřek plic, srdce, reprodukční a vylučovací systémy. Těž dá základ pro slezinu a pro produkci krevních buněk. (7)

**Entoderm** – „později vyformuje linii jazyka, zažívacího traktu, plic, žaludku a několika žláz. (7)

Pro udržení funkce žlutého tělíska (*corpus luteum*), je důležitá produkce lidského choriového gonadotropinu, ten zvyšuje počet receptorů pro LH a podporuje produkci testosteronu stimulací fetálních Leydigových buněk, než začnou jeho produkci řídit fetální gonadotropiny. Tato fáze začíná 9. den od oplození **buňkami trofoblastu.** (5)



Obrázek 2 Vyobrazení tří týdněho vývoje vajíčka

### 1.3.Placenta

Nedílnou součástí fyziologického vývoje nového jedince je vznik a vývoj placenty neboli plodového lůžka, před vývinem placenty podporuje vývoj funkční corpus luteum produkcí estradiolu a progesteronu, což jsou nutné hormony pro udržení těhotenství.

Lidská placenta má tvar disku, chorion je vnější krycí vrstvou, vnitřní je amnion mezi nimi se nachází membrána. Amnion tvoří vak vyplanění amniotiskou tekutinou, v níž je uložen plod, složení tekutiny není během celého těhotenství stejné. Z počátku je izotonické, později obsahuje moč plodu, odloupané epitelové buňky plodu, placenty a jeho objem se kontinuálně zvyšuje. Invazivní odběr plodové vody (*aminocentéza*) umožňuje prenatální diagnostiku vrozené vývojové vady nebo onemocnění plodu.

Během 11. dne do 16. dne těhotenství exponenciálně pokračuje vývoj trofoblastu.

Kolem 15. dne vyrůstají na povrchu chorionu sloupce trofoblastu, které formují primární choriové klky. Vyplněním primárních klků mesenchymem vznikají klky sekundární, které jsou složeny z vnější vrstvy syncytiotrofoblastu, vnitřní vrstvy cytotrofoblastu a mesenchymálního jádra. Přívod mateřské krve do placetny zajišťují spirálové arterie, jimž stěnu rozrušuje cytotrofoblast, krev se vlévá do intervilózních prostorů mezi klky. Koncové úseky těchto arterií jsou cytotrofoblastem narušovány, ty nahrazují endothelové buňky a vzniká tak hybridní céva, která společně obsahuje mateřské buňky spolu s fetálními buňkami. S vaskularizací se ze sekundárních klků stávají definitivní terciální klky (8). Dalším krokem vývoje placenty je vznik úponových klků, jejichž zakončení plavou volně v krvi intervilózního prostoru. Zhruba do 8. týdne je povrch chorionu bohatý na klky, chorion se postupně rozlišuje na dvě části – větší chorion laeve (bez choriových klků) a menší chorion frondosum, kde choriové klky rostou a rozčleňují se. Chorion frondosum spolu s decidua basalis vytváří lůžko neboli placentu (9). Další vývoj placenty vyžaduje stálý růst velikosti a délky klků v oblasti chorion frondosum a expanzi intervilózního prostoru. (9; 8)

Placenta se stává plně funkční od druhého trimestru. Zaban a spol. uvádí, že velikost placenty je v průměru 15–20 cm, přičemž tloušťka může dosahovat 3 cm. Zaujímá 17% hmotnosti plodu, zhruba 500 g, tvořena je z 50 % mateřskou krví a 15 % tvoří fetální krev. (10)

### 1.3.1. Funkce placenty

- výměna dýchacích plynů, kyslíku a oxidu uhličitého prostou difuzí na základě gradientu rozdílných parciálních tlaků mezi krví matky ( $pO_2 = 50$  mm Hg) a plodu ( $pO_2 = 30$  mm Hg), (5)
- facilitovaná difuze umožňuje přístup živin k plodu (např.: glukózu), sekundární aktivní transport zajišťuje přenos aminokyselin. (5)
- placentární bariérou prostupují i katabolity produkované plodem. (5)
- hormonální produkce – choriový gonadotropin, estrogen, progesteron.

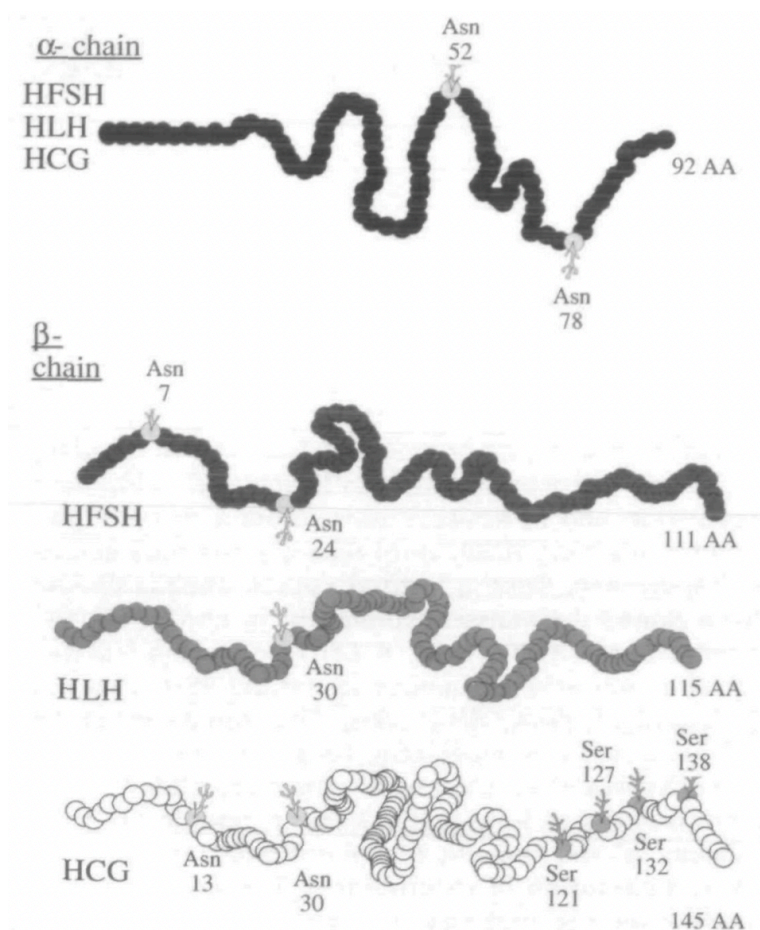
Přes placetu mohou procházet i potencionálně škodlivé látky, které by mohly negativně až fatálně ovlivnit vývoj plodu, součástí této skupiny jsou alkohol nebo nikotin.

## 1.4. Měsíční vývoj plodu

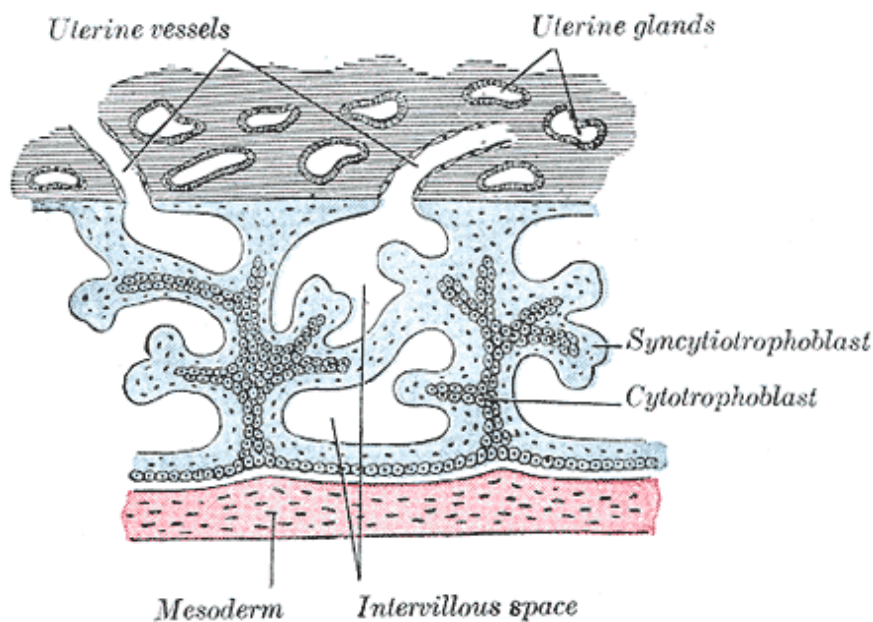
1. měsíc (4. týdne) – vyvíjí se mícha, srdce, oči a uši, bije srdce
2. měsíc (8. týdne) – probíhá vývin rukou a nohou, embryo se začíná pohybovat, nicméně matka jeho pohybu zatím není schopná pocítit, jsou vyvinuty základy orgánových struktur
3. měsíc (13. týdne) – začíná fáze plodu, přes fonendoskop je slyšitelný tlukot srdce, na prstech začínají růst nehty a jsou zřejmé otisky prstů. Plod měří průměru 10 cm a váží 150 g.
4. měsíc (17. týdne) – začínají se formovat lidské rysy v obličeji, plod je schopný vnímat matčin hlas. Plod dorůstá v průměru 16 cm a váží 250 g.
5. měsíc (21. týdne) – plodu sílí svaly, vytváří se kůže s vrstvou lanugo, probíhá tvorba závitů. Plod měří průměru 19 cm a váží 350 g.
6. měsíc (25. týden) – kůže je v tenké průhledné vrstvě, plod je aktivní, orgány v hlavních rysech vyvinuté, reálná šance přežití při předčasné porodu
7. měsíc – plod rychle roste, přibírá na váze, může plakat, pracuje se všemi pěti smysly, oddělují se původně srostlá oční víčka.
8. měsíc – plod se otáčením hlavou dolů připravuje na porod, přibývá tuková hmota, dorůstá mozek, sestupují varlata do šourku, vysoká šance přežití při předčasném porodu
9. měsíc – plod je připraven na porod, do plodové vody odpadá lanugo a nehty jsou kulaté, velikost se pohybuje okolo 48 cm a váží od průměrně 2800 g. (7)

## 2. LIDSKÝ CHORIOVÝ GONADOTROPIN

Lidský choriový gonadotropin (Human chorionic gonadotropin (hCG)) je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek, které utvářejí molekulovou charakteristiku pro skupinu glykoproteinových hormonů, rozdílem od jiných hormonů této skupiny (FSH folikulostimulační hormon, LH luteinizační hormon a TSH tyreotropní hormon) je, že nevzniká v adenohipofýze, ale je produkován syncytiotroblastem placenty během těhotenství (11). Jednotlivé členy rodiny glykoproteinových hormonů od sebe vzájemně odlišuje jedinečnost  $\beta$  řetězce chemická struktura  $\alpha$  řetězec je charakteristická pro všechny hormony ze skupiny.



Obrázek 3 Schematické znázornění proteinové primární struktury  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek gonadotropinů + počet aminokyselin jednotlivých podjednotek

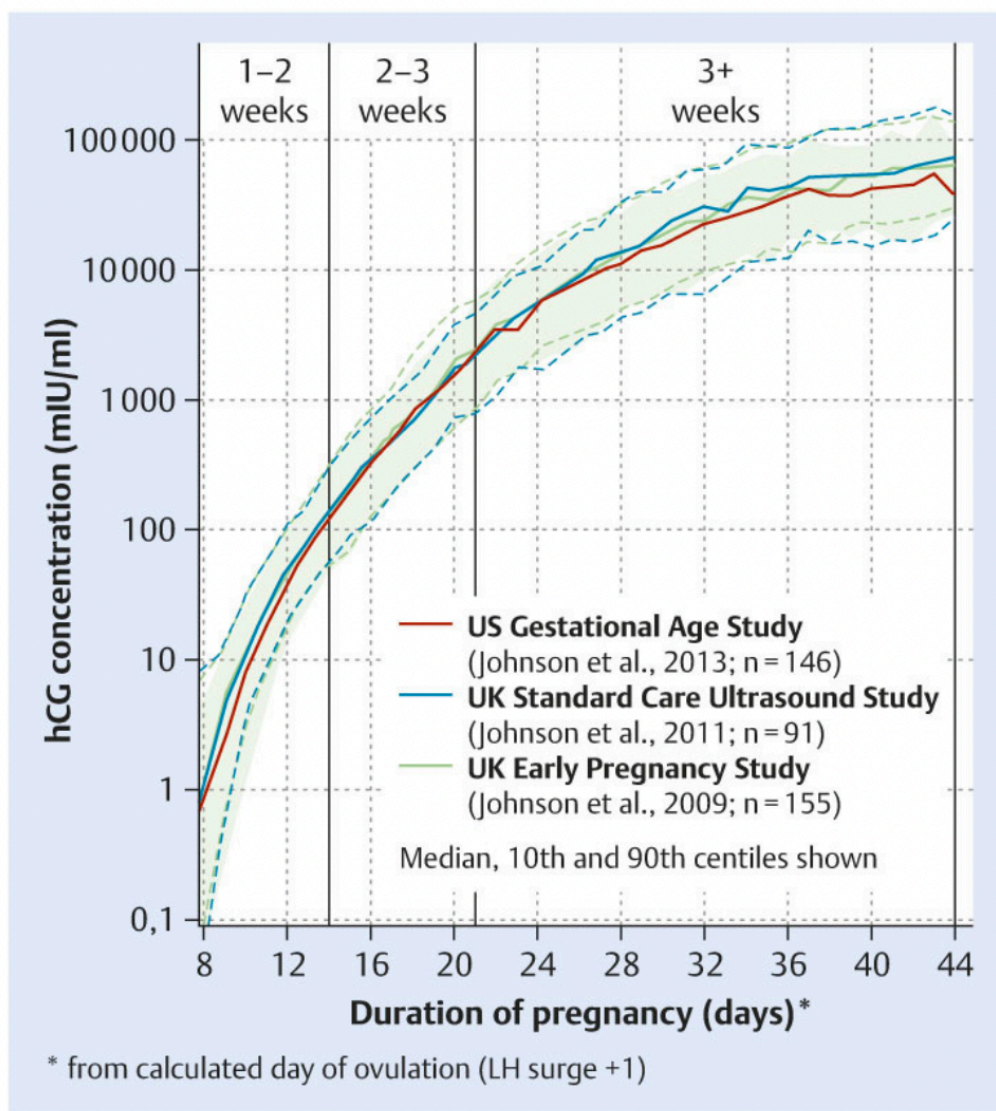


Obrázek 4 Znárodnění struktury syncytiotroblastu (zdroj produkce hCG) a primárních klků zanořujících se do embrya, následuje vývoj sekundárních a terciálních klků. Z syncytiotroblastu trofoblastu a mateřského endometria nakonec vzniká placenta.

Hladina v krvi hCG může být sledována z různých důvodů, za zdroj zvýšené koncentrace může přítomnost nádorů germinativního a trofoblastického původu, v gynekologii je zásadním markerem pro včasnou diagnózu těhotenství a to včetně mimoděložního, mnohočetné gravidity, hrozícího potratu nebo onemocnění mola hydatidosa.

Fyziologická hodnota hCG se během těhotenství mění a je pro jednotlivá období odlišná, na počátku těhotenství jeho hladina v moči nebo krvi rychle roste a maximální hodnoty nabývá mezi druhým a třetím měsícem těhotenství, poté nastává pokles velikosti píku, a to až do počátku posledního trimestru, kdy jeho hladina zůstává konstantě. Detekovatelné množství hCG se v mateřském oběhu objevuje kolem 8. – 10. dne po početí (12; 13).





Obrázek 5 Denní zvýšení hCG v moči v časném těhotenství ve třech různých studiích: The UK Early Pregnancy Study, UK Standard Care Ultrasound Study a US Gestation Age Study (C. Gnoth, 2014)

Během 8. dne od početí je možné detegovat hCG v mateřském oběhu, podobného data detekce lze dosáhnout i v moči matky. Následující dny je koncentrace v séru přibližně 10 mIU/ml. S postupem těhotenství se hladina hCG zvyšuje přibližně o 50 % za den a maxima dosahuje kolem 10. týdne, kdy je hladina přibližně 100 000 mIU/ml, poté klesá, v průběhu těhotenství zůstává konstantní při hladině 20 000 mIU/ml. Od 9. dne je koncentrace v moči přibližně 0,93 mIU/ml. Vrchol nejvyšší koncentrace hCG v moči je kolem 45. dne od početí (14; 15).

## 2.1. Historie

Díky objevu hormonů došlo na počátku 20. století k vývoji skutečně spolehlivých testů. Ernest Starling a William Bayliss izolovali z moči těhotné ženy specifické hormony, vědecký průlom datován k roku 1905 (16). Němečtí gynekologové Slemar Aschheim a Bernhard Zondek vyvinuli v roce 1927 první biologický test pro včasné testování gravidity, jeho název se odvíjel od jmen vědců – A-Z test. Aschheim a Zondek na podkladě nových informací o hormonech odhalili důležitost přední hypofýzy ve fyziologické funkci vaječnicků, navazovaly na poznatky Ludwig Fraenkel z roku 1903, jež jako první publikoval poznatky

o lidském žlutém tělísku a pojmenoval hormon progesteron. I přesto že Aschheim a Zondek samotný objev hCG nečinili jejich test na principu vstříkání testované moči pohlavně nezralým myším byl funkčním těhotenským testem, díky správnému předpokladu, že moč těhotné ženy ovlivní pohlavní vývoj myši a počne její říje. A-Z test prokazoval spolehlivost 98,9 % (16; 17; 18) . Leif Wide a Carl Gemzell v roce 1960 využívali směs moči pacientky a protilátek hCG pro aglutinační test, princip testu byl účinný avšak nedodatečně citlivý. V roce 1978 se na americkém trhu poprvé objevili domácí testovací sady, který vycházeli z objevu Judith L. Vaitukaitis a Glenn Braunstein učiněného v roce 1972, kdy vytvoření radiomunoanalýzy in vino postavené na citlivosti pro podjednotku beta, specifickou hCG podjednotku, učinilo test citlivým i průkazným a definovalo testy pro následující dekády (16; 17).

## 2.2. Struktura hCG

Lidský chodirogonadotropin patří mezi opravdu zajímavé molekuly v lidském těle. Patří totiž mezi nejkyselější glykoproteiny obsahující nejvyšší podíl cukerných postranních řetězců (25-41% molekulové hmotnosti (19)) a nejdelší cirkulují molekuly v lidské krvi (s cirkulující poločasem 36 hodin (20)) , s širokým spektrem biologických funkcí. Od implantace blastocytu a vývoje placenty přes zajištění růstu plodu ke klíčovému řízení steroidogeneze během menstruačního cyklu a ovulace oocyt po řízení rakovinného růstu u člověka. Mimo jiné nedílnou součástí klíčových funkcí hCG je evoluční význam při



prenatálním vývoji mozku. Jednotlivé bioptické procesy mají své koordinátory v jedinečných variantách, o konzistentním složení aminokyselinových sekvencí,  $\alpha$ -podjednotkou (91 AMK, molekulární hmotnost 14 kD) (15; 21) a  $\beta$ -podjednotkou (145 AMK, molekulární hmotnost 23kD) (15; 21) , s nekonzistentními funkcemi a zdrojem produkce. Pro nejdůležitější varianty byly vytvořeny standardy dle WHO: (15; 22)

- intact hCG ,
- nicked intact hCG,
- free  $\beta$ -subunit,
- free nicked  $\beta$ -subunit,
- free  $\beta$ -core,

LH a hCG produkované v těhotenství působí na stejný receptor a tím mají vliv na proces vývoje žlutého tělíska a produkci progesteronu. Zatímco volná  $\beta$ -podjednotka hCG a hyperglycosylated hCG se vážnou a antagonizují receptor TGF- $\beta$ , ukazují se jako autokriny fungující samostatně. (20) Fyziologická a patologická diagnostika se neobejde bez znalosti strukturních variant hCG, jejich exprese i degradace.

Mezi další varianty forem hCG spadá hCG-H (hyperglykosylovaný hCG), ten je odnoží „normálního“ hCG s většími komplexními oligosacharidovými postranními řetězci pozorovanými u choriokarcinomu (23). A však tato forma není součástí Mezinárodních standart WHO, jelikož všechny prováděné studie používali protilátky B152, ta ale není komerčně dostupná a potvrzení pomocí nezávislých činidel nebylo možné. (23; 15)

Chemickou strukturu podjednotek- $\alpha$  i podjednotek- $\beta$  utvářejí tři smyčky připoutané cystinovým uzlem pomocí tří disulfidických můstků. Takovou to chemickou strukturu mají mimo jiné i transformující růstové faktory  $\beta$  TGF- $\beta$ , neuronální růstové faktory (NGF) či destičkové růstové faktory (PDGF  $\beta$ ) a jiné růstové faktory. Smyčky 1 a 3 tvoří jeden z konců obou podjednotek, zatímco smyčka 2 utváří konec druhý. Stabilizace je zakotvena v podjednotce –  $\beta$  díky čtvrtému disulfidickému můstku. Prostorová orientace molekuly připomíná podobu „cigaretové molekuly“ – orientace  $\alpha$  a  $\beta$  protilehlé s ukončením struktury párovými smyčkami 1 a 3. Přičemž podjednotka- $\alpha$  je pomocí další smyčky ukotvena v podjednotce  $\beta$  – útvar s označením „bezpečnostní pás“ důležitý při vazbě na receptor. Z kompaktní molekuly na podjednotce hCG $\beta$  vystupuje C-koncový peptid (CTP,  $\beta$ 113-145). (24; 25).

K zániku  $\beta$  – podjednotek dochází v ledvinách, na degradaci se podílejí i makrofágové enzymy, z degradované podjednotky vzniká fragment  $\beta$  podjednotkového jádra ten se dostává do moči a je možné provádět jeho detekci. (26)

### 2.3. Patologická produkce hCG

### 2.4. Gestační trofoblastická nemoc (GTN)

GTN vzniká z anomálií při vývoji placenty a přes premaligní poruchy dosahuje až maligních poruch, jedná se o skupinu patologicky ojedinělých stavů, které se nepodléhají běžným mechanismům. Diagnostika probíhá pomocí sledování hCG, histologických i molekulárně genetických metod a studií. V 1. trimestru je diferenciální diagnostika nespolehlivá, spolehlivější je diferenciální diagnostika hCG v dalších trimestrech. Charakteristickým znakem mol je nesnižující se hladina hCG po dosažení 12. týdne těhotenství, pokud je těhotenství fyziologické hladina hCG by od této chvíle měla klesat → supsekece na maligní transformaci tumoru (27). Monitorování hCG je podstatné pro včasnou diagnostiku Gestační trofoblastická nemoc (GTN). Histologicky zahrnuje GTN: (28; 29)

Tabulka 1 Dělení GTN podle úrovně zhoubnosti onemocnění (28)

PREMALIGINÍ	MALIGNÍ
Parciální (inkompletní) mola ( <i>Mola hydatidosa partialis, MHP</i> )	Perzistující trofoblastická nemoc ( <i>PTN</i> )
Kompletní mola ( <i>Mola hydatidosa completa, MHC</i> )	Choriokarcinom
Proliferující mola ( <i>mola proliferans, mola destruens, MP</i> )	Trofoblastický nádor v místě placenty ( <i>PSTT</i> )
	Epiteloidní trofoblastický nádor ( <i>ETT</i> )

- Čestnost onemocnění GTN je evidována s vyšším výskytem v Asii, na Blízkém východu a v Africe, důvodem by mohly být obtíže při získávání přesných údajů. (29)
- Čestnost **parciálního (inkompletní) mola** se pohybuje mezi 0,57 až 2 na 1000 těhotenství. (30; 29)
- Zvýšené riziko onemocnění **kompletní mola** je u žen v počátečních letech reprodukčního věku a u žen v letech pozdního reprodukčního věku. Jedná se o 7,5x větší šanci než pro věkovou skupinu 21-35 let. (31; 29)
- Riziku **choriokarcinomu** v USA a Evropě podléhá 1 ze 40 000 těhotných žen, v Japonsku 3,3 ze 40 000 těhotných žen a v jihovýchodní Asii 9,2 na 40 000 těhotných žen. (30; 29)

Tabulka 2 Dělení GTN dle skupiny rizika (28)

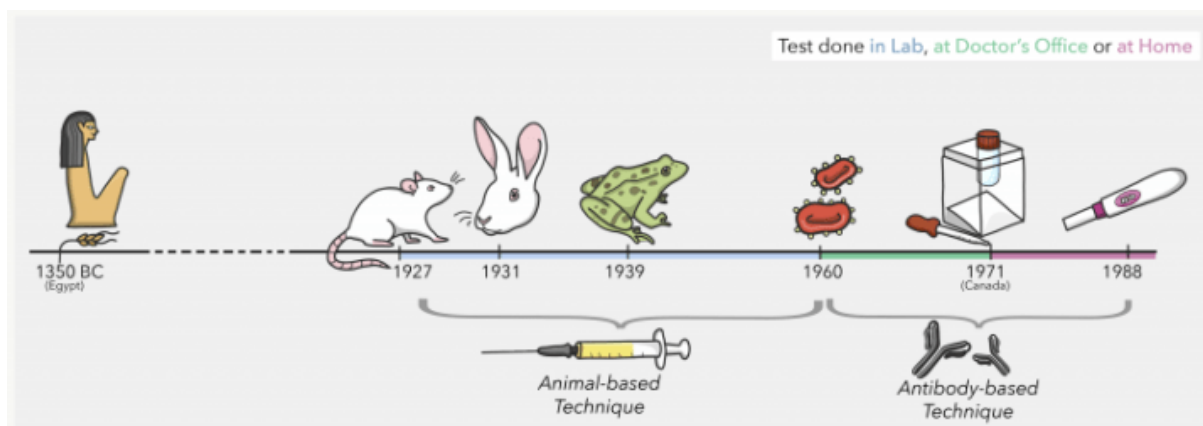
SKUPINA PACIENTEK			
NÍZKÉ RIZIKO	VYSOKÉ RIZIKO	ULTRA VYSOKÉ RIZIKO	REZISTENTNÍ
Monoterapie	Kombinovaná terapie	Indukční chemoterapie	* Počáteční šetrná chemoterapie, hysterektomií, laparotomie, radioterapie
* možnosti léčby podléhají limitům udávající ložisko a míra onemocnění.			

## Germinativní tumory varlete

Screening a diagnostika hCG má význam pro diferenciální diagnostiku tumorů varlete, zhodnocení stadia onemocnění, monitorování léčby nebo v případě genetických predispozic rozvoje germinativního nádoru lze pozorováním hladiny hCG v séru použít jak pomocnou metodu prevence i odhalení tumoru. Choriokarcinomatózní a syncytiotrofoblastické složky tumorů vylučují hCG. (27)

### 3. HISTORICKÉ METODY STANOVENÍ TĚHOTENSTVÍ

Písemné zmínky o těhotenských testech nalézáme již v dochovaných dokumentech ze starověkého Egypta. Kolem roku 1350 před naším letopočtem ženy opakovaně během několika dní pomočovaly semena pšenice a ječmene, za pozitivní výsledek testu bylo bráno klíčení semene, naopak nevyklíčení značilo negativní výsledek testu. Touto metodou bylo možné zjistit jednak těhotenství ženy a také pohlaví plodu, klíčení ječmene poukazovalo na chlapce, zatímco pšenice na dívku. Studie z roku 1963 zjistila, že semena ječmen a pšenice, které byly polévány močí mužů a netěhotných žen nezačali růst, zatímco moč od těhotných žen vyvolala růst v 70 % případů (32). Avšak pohlaví plodu není možné touto metodou stanovit. Vědci usuzují, že možné klíčení by mohla způsobovat zvýšená hladina estrogenu v moči. (32)



Obrázek 6 Časová osa vývoje těhotenských testů

Znalosti anatomie nebyly v historii vždy slčitelné s opravdovou fyziologií těla a i přes snahu lidské tělo dostatečně pochopit nebylo možné nebo dostupné tělo správně poznat, i z těchto důvodů se Hippokrates, otec „moderní“ medicíny, domníval, že při těhotenství se děloha ženy tzv. uzavře a skrz dělohou do těla nic neprojde. Z tohoto nesprávného úsudku doporučoval ženám si vkládat přes noc do pochvy cibuli a pokud jim druhý den byl z dechu cítit cibulový odor, žena by těhotná nebyla, jelikož silice cibule prošli přes dělohu do těla, zatímco při těhotenství by druhý den ráno z jejího dechu nic cítí nebylo. (33)

Ať už se jedná o jakoukoliv historickou dobu, není období těhotenství pro ženu vždy jednoduché a bezpečné, obzvlášť náročné to měly ženy v starověku i středověku, medicína nebyla na tak vysoké úrovni jako je dnes a ani zdaleka neměla žena v těhotenství, takové možnosti jako má v dnešní době. Graviditu nemusely nastávající maminky poznat do pátého až šestého měsíce.

Ačkoliv není intuitivní, že by detekce těhotenství mohla vycházet z moči, byla právě moč nejčastěji využívaná pro analýzu. Jak již bylo výše zmíněno některé testy, kupříkladu egyptský, dokázaly detekovat těhotenství správně, jiné byly poněkud bizarní a jejich principy neměly často žádný prokazatelný výsledek, k těmto například patřily testy, při kterých měl v moči těhotné ženy zrezivět hřebík, změnit barvu list či být v moči populace živých tvorů. Ani o něco málo bizarní nebyl první z moderních testů, který byl vyvinut roku 1927 německými vědci Aschheim a Zondekem, kteří zjistili, že injekce moči těhotné ženy vyvolá **růst myších pohlavních orgánů** u sexuálně nezralých samečků. Vyhodnocení testu trvalo minimálně týden a při jeho provádění bylo nutné zasílat moč do laboratoří (32; 34). Dalším z testů, které se prováděly na zvířatech byly **testy pomocí žab**, ty byly vyvinuty britským vědcem Lancelotem Hogbenem. Velkým rozdílem od myších testů bylo, že žáby nemusely být pro vyhodnocení pitvány, jelikož se posuzovaly žabí vykladená vajíčka a žabí samečky mohly být využity znovu. Tím se snižovaly náklady na test a tento test se stával dostupnější, mimo to byl rychlejší, výsledky byly dostupné do dvanácti hodin, nevýhodou, ale stále zůstávalo laboratorní provádění. (32)

K velké změně došlo v 60. letech minulého století, kdy započala doba testování bez použití živých zvířat. Roku 1971 vyvinul Dr. Vaitukaitis, Braunstein a Ross test, jenž dokázal vyhodnotit těhotenství během 2. – 3. týdne po početí. Princip testu spočíval v **označení ovčích erytrocytů protilátkami hCG**, roztokem s hCG protilátkami a testovanou močí.

- Při provádění testu se smíchaly všechny složky dohromady a při vyhodnocování se posuzovalo shlukování vzorku, při obsahu hCG v moči, při těhotenství, tyto molekuly reagovaly s protilátkami v roztoku a na ovčí erytrocyty se nenavazovaly, k shlukování by nedošlo, pokud by ale žena těhotná nebyla, došlo by k agregaci protilátek na krvinky a test by byl vyhodnocen jako negativní.

Čtení výsledků nebylo těžké a doba testování byla zkrácená na několik minut či hodin. Test se stal rutinní záležitostí, nicméně pro otestování bylo stále nutné navštěvovat lékaře. (32)

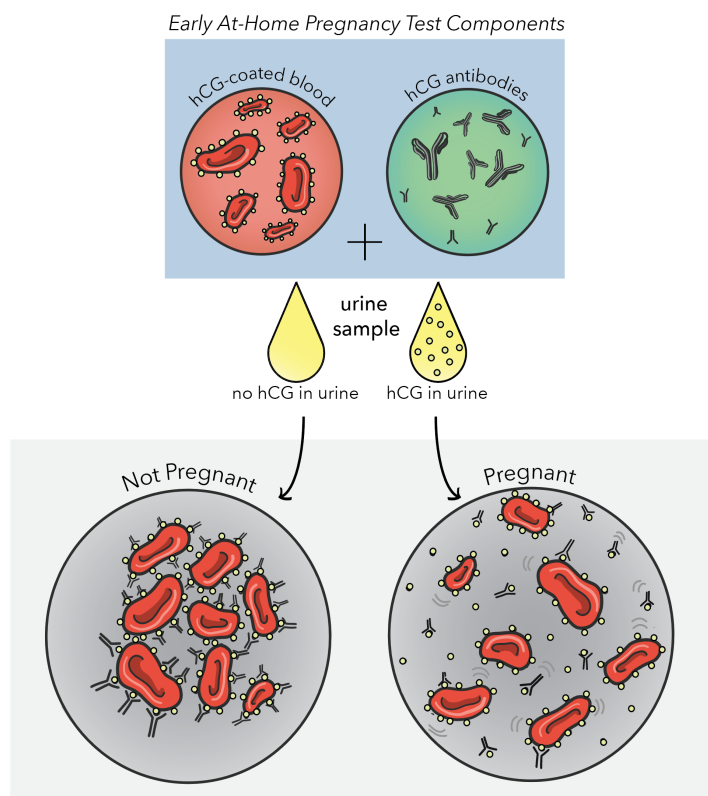
To se ale změnilo v 70. letech v Kanadě, kdy na trh vstupuje **první domácí test**, princip zůstává stejný, stále jsou využívány ovčí erytrocyty a sérum protilátek proti hCG. Testovací sada dále obsahovala zkumavky a kapátka. Test musel být prováděn pečlivě a krok po kroku, jak určoval návod, posledním krokem před vyhodnocením bylo ponechat zkumavky 2 hodiny bez vibrací. Při správnosti postupu byl pozitivní výsledek s pravděpodobností 97 % a negativní s pravděpodobností 80 %. (32)

## 4. TESTY PRO SAMOVYŠETŘENÍ

Oproti dobám minulým a znalostem dnešní doby jsou těhotenské testy dostupnější, rychlejší a kvalitnější. Ženy již nemusí pomočovat semena ovesa a pšenice nebo podstupovat několika krokový test a čekat dvě hodiny na výsledek.

I přesto jsme u testů vycházející z testování moči zůstali a jako první volbu samotestování, tzv.: domácího testování, volíme imunochromatografické testy, ty jsou na trhu dostupné od různých značek a vzájemně se od sebe mohou lišit možnostmi provádění testu – z proudu moči nebo test ponořit do nádobky se vzorkem, také lze již z testu zjistit týden těhotenství či se testy odlišují svou citlivostí. Test s citlivostí 10 mUI/ml lze použít již pár dní před očekávanou menstruací, zatímco test s citlivostí 25 mUI/ml dokáže vyhodnotit spolehlivé výsledky první den po očekávání menstruace. Další možností domácího testování je test z krve, kde je součástí testovací sady lanceta na provedení vpichu do prstu a souprava na odběr malého vzorku krve. (35).

Ročně se na evropském trhu prodá 65 milionů jednorázových těhotenských testů (36). „Přes 99 %“ a „vysoká citlivost“ jsou hesla, která se objevují jak na krabičkách domácích testů, tak v příbalových letácích a to i přesto, že většina volně projedených těhotenských testů nebyla testovaná v nezávislých studiích s relevantním hodnocením zdravotnických technologií, nepodlehla metaanalýzám nebo jiným klinickým a diagnostickým kontrolním studiím. (37; 15). Těhotenské testy na americkém trhu musí splňovat zásady dle FDA (Americký úřad pro potraviny a léčiva).



Obrázek 7 Schéma časného těhotenského testu na bázi protilátek

1. citlivost testu, což je koncentrace hCG, při které se očekává, že test vrátí pozitivní v > 95 % případů; (15)
2. studie srovnávání metod, kde je přístroj srovnáván se srovnávacím přístrojem; (15)
3. míra detekce těhotenství, pokud se testování provádí před očekávanou menstruací, tj. procentuální míra zjištěných výsledků těhotenských výsledků v jednotlivých dnech vzhledem ke dni očekávané menstruace. (15)

Tyto zásady jsou výrobci mnohdy dodržovány i na evropském trhu, i přesto, že evropský trh donedávna podléhal nedostatkem pokynů pro standardizaci, to ale mění nařízení o diagnostice in vitro. Nahrazení současné evropské směrnice (98/79/EC) a plné implementování v Evropě do roku 2022. (36; 15; 38)

Mezi analyzátory, které vyhodnocují těhotenství v místě péče pacienta, patří POCT analyzátory (z angličtiny point of care testing). Ty nalzáme na urgentních příjmech, lůžkových odděleních v ordinacích praktických lékařů a jiných lékařských zařízeních nebo přímo u pacienta (diabetici, hemofilici). POCT metody se uplatňují u mnoha diferenciálních diagnostik nejčastěji v místě akutní péče, diagnostické pole POCT je široké mimo těhotenství (měření hCG) lze měřit glykemie, provádět stanovení glykovaného hemoglobinu, chemické vyšetření moči, stanovení c-reaktivního proteinu (CRP) a jiná. Detekce těhotenství díky POCT být pozitivní již po 7-10 dnech od otěhotnění, detekce je ale doporučovaná až týden po vynechání menstruace (39; 40; 41).

#### **4.1.1. Imunochromatografické „screeningové“ testy**

Princip je založen na chromatografické separaci látek, kdy je kapalina nasycena na pevné fázi kolony. Kapalný vzorek po nanesení do absorpční vrstvy – startovacího pole se postupně kapilárním vztláním posouvá po pevné – mobilní fázi k zafixovaným reagentům, jež reagují s analytem ze vzorku. Díky označení navázaném na reagentii je průběh reakce možné vizualizovat a pouhým okem vyhodnotit. Vyhodnocení provádíme do několika minut, výsledek lze honit jako přítomnost nebo nepřítomnost sledovaného analytu, tedy určit pozitivní nebo negativní reakci.



Materiálem pro pevnou fázi mohou být nitrocelulózkové, nylonové nebo polyvinylidendifluoridové membrány, materiálem pro kapalnou fázi mohou být sliny, moč, pot, kapilární krev. Plná venózní krev, sérum nebo jiné biologické materiály, však vyžadují zpracování vzorku před vlastní analýzou, výsledek možné stanovovat pouze v ambulanci lékaře nebo v diagnostické laboratoři.

Pomocí screeningových testů můžeme ve vzorku prokazovat nízkomolekulární i vysokomolekulární látky, např:

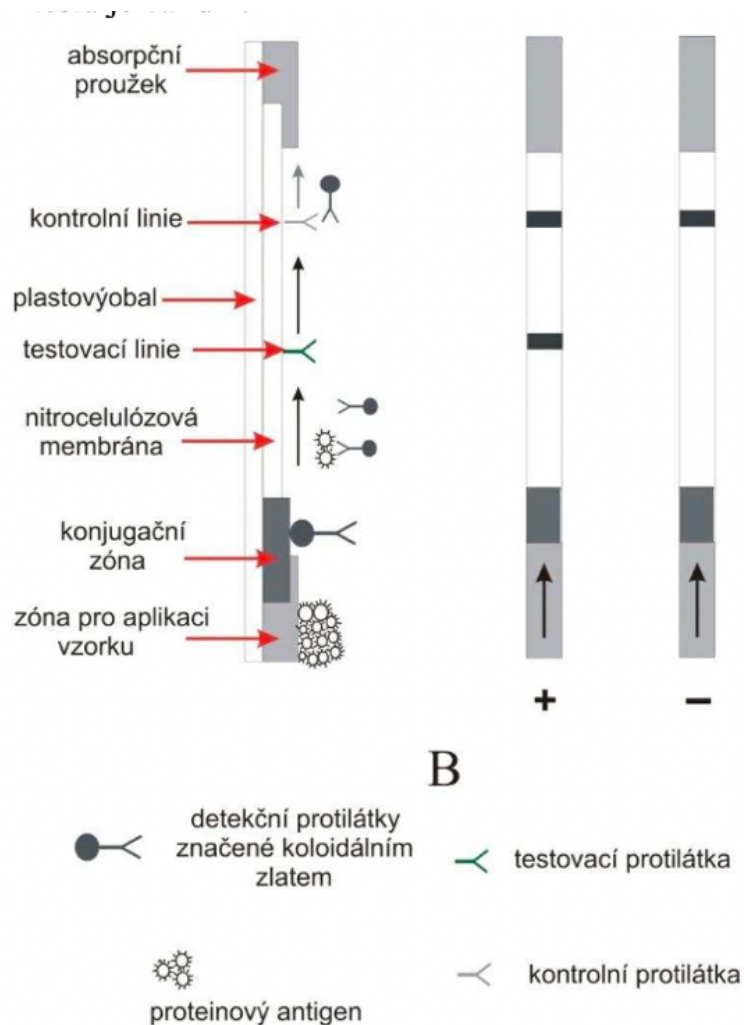
- **Specifické protilátky** (např.: detekce antigenu SARS-CoV-2 ze slin)
- **Hormony** (např.: detekce lidského hCG v moči)
- **Drogy** (v testu se ověřuje přítomnost látek z jednotlivých skupin, např.: amfetaminy, benzodiazepiny, kanabinoidy, kokain, fencyklidin, u orientačních imunochemických testů je prokazována skupina příbuzných drog (např. opiáty), není možné rozpoznat jednotlivé příbuzné druhy drog (v případě opiátů nerozlišíme kodein, morfin, heroin)
- A jiné

Základem těchto testů jsou specifické protilátky, ty jsou nejčastěji značené koloidním zlatem, latexovými mikročásticemi v komplexu s molekulou barviva, fluorizačními imonolipozómy apod. Díky značení protilátek lze vyhodnotit zakoncetování v testovací nebo kontrolní zóně – vizualizace reakce. (42)

#### 4.1.1.1. Test pro kvalitativní detekci hCG

Test funguje na principu sendvičového uspořádání, ten využívá dvě různé protilátky, které od sebe odlišuje epitopovou specifita ke stejnému antigenu. Jedna z protilátek, první v pořadí při postupu vzorku testem, je rozptýlená v konjugační zóně za místem pro nanášení vzorku, jedná se protilátky anti-1hCG tvaru Y, které jsou značeny koloidním zlatem, pro vizualizaci reakce. Tato značená detekční protilátka (tzv.: konjugát) vytváří v případě přítomnosti antigenu ve vzorku imunokomplexy [hCG-protilátka 1- barvivo], které jsou unášeny kapalinou dál nitrocelulózkovou membránou k testovací linii. V testovací linii jsou imunokomplexy zachycené na fixované Y protilátce anti-2hCG (tzv.: capture antibody),

vzniká tzv. sendvičový komplex [protilátka 2hCG-protilátka 1barvivo]. Enzym (koloidní zlato) je navázán na detekční protilátku se zakoncertuje a v testovací zóně vznikne okem viditelný proužek. Proužek v testovací zóně (T) značí pozitivní výsledek.



Obrázek 8 Schéma sendvičového uspořádání imunochromatografických testů VML

Přebytek imunokomplexu postupuje dál na kontrolní zónu, kde je zachycen na proužku fixovaných anti-IgG protilátek. Proužek vzniklý v kontrolní zóně (C) značí, správné provedení testu a výsledek lze považovat za validní.

Pokud ve vzorku moči není přítomný hCG antigen, konjugát zůstává volný a při průchodu testovací zónou není vázán k fixovaným protilátkám. V testovací zóně (T) proužek nevzniká, výsledek testu je negativní. Volné značené detekční protilátky jsou unášeny do kontrolní zóny (C), kde jsou zachyceny na proužku fixovaných anti-IgG protilátek. Proužek

vzniklý v kontrolní zóně značí správné provedení testu a výsledek lze považovat za validní. (43; 42)

#### 4.1.2. Domácí testovací sada ze vzorku moči

Mezi nejpokročilejší i uživatelsky atraktivní těhotenské testy patří digitální těhotenský test Clearblue s indikátorem týdnu těhotenství. Test je citlivý na hladinu hCG v moči

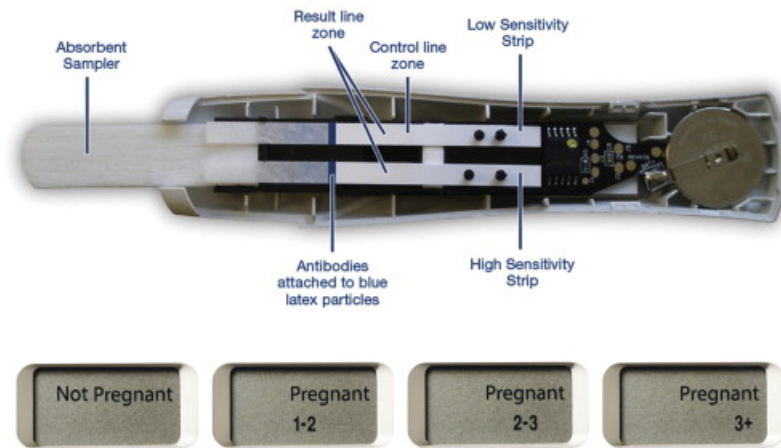
a výsledek kategorizuje do čtyřech skupin „not pregnant“, „pregnant 1-2“, „pregnant 2-3“ a „pregnant 3+“. Práh (při kterém 50 % výsledků spadá do sousedních kategorií) pro stanovení výsledků:

*Tabulka 3 ClearBlue těhotenský test – práh pro stanovení výsledků*

<b>PREGNANT 1-2</b>	<b>PREGNANT 2-3</b>	<b>PREGNANT 3+</b>
10,2 mIU/m	153 mIU/ml	2 750 mIU/ml

Materiál absorbující vzorek je propojen se dvěma testovacími proužky, jeden s nízkou senzitivitou a druhý s vysokou senzitivitou. Testovací část s nízkou senzitivitou obsahuje jeden práh detekce, který rozlišuje dobu trvání těhotenství od „pregnant 2-3“ a „pregnant 3+“. Zatímco testovací část s vysokou senzitivitou má dva prahy detekce, jen pro určení, zdali

je žena vůbec těhotná druhý pro selekci na kategorie „pregnant 1-2“, „pregnant 2-3“ a „pregnant 3+“. Doba trvání těhotenství je vztažena na dobu od ovulace, k době od posledního dne menstruace. (44)



Obrázek 9 Vnitřní struktura Clearblue těhotenského testu + týdenní vyhodnocení (44)

## 4.2. Test pro kvalitativní detekci lidského hCG ze vzorku krve

Stanovit zdali je žena těhotná je také možné pomocí krevních testů, ty mohou být prováděny domácí sadou nebo z krve odebrané u lékaře a poté testované v laboratoři, tato metoda není rutinní, na krevní vyšetření žena dochází až později v průběhu testování, ale i přesto je možné zjistit těhotenství touto cestou. Krevní testy mají přesnost stejně vysokou jako mají i močové testy, nicméně jejich výhodou je vyšší citlivost:

- laboratorní krevní testy detegují přítomnost hCG v periferní krvi již při koncentraci 1 až 2 mIU/ml, domácí krevní testy mohou detegovat hCG již od 10 mIU/ml.

Další výhodou krevních testů je nižší pravděpodobnost falešně negativního výsledku, test z moči může být falešně negativní při nadměrné hydratace, zředění vzorku, popřípadě mohl být použit příliš brzy. Hladina hCG se v těle zdvojnásobuje každých pár hodin.

### 4.2.1. Domácí testovací sada ze vzorku krve

Testování ze vzorku krve si žena může provádět sama v pohodlí domova sadou zakoupenou v drogerii nebo lékárně, testovací sada obsahuje testovací kazetu, pipetu, alkoholovou utěrku, sterilní lancetu a pufrový roztok.

Vzorek krve je odebírán z prstu lacetou do pipety, prst je nutné předem očistit alkoholovým ubrouskem a pro větší prokrvení jej promasírovat. Do vyznačeného místa na kazetě je nanesen vzorek krve, po jeho absorbování na stacionární fázi je do téhož místa v množství které uvádí návod přidán pufrový roztok. Odečet výsledku se provádí mezi

5. až 10. minutou od smíchání obou reagensů.

- za pozitivní výsledek jsou brány dvě čárky, jedna v testovací oblasti (T) a druhá v kontrolní oblasti (C), i hodně bledá čárka (tzv.. ducha) je posuzována jako pozitivní výsledek,
- za negativní výsledek je brán výsledek s čárkou pouze v kontrolní oblasti (C),
- neplatný výsledek je posuzování jako čárka pouze v testovací oblasti nebo neobjeví-li se žádná průkazná čárka. (45)

*Tabulka 4 Domácí krevní test – výhody a nevýhody*

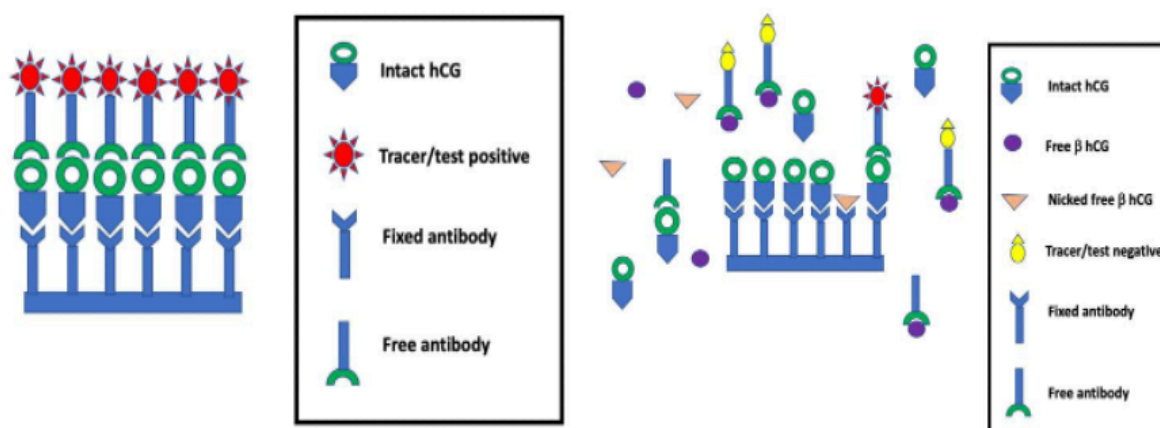
VÝHODY	NEVÝHODY
Rychlost výsledku	Vlastní odběr vzorku krve
Citlivost od 25 IU/l	
Forma domácího testu	
Přesnost 98 %	

#### 4.2.2. Falešně negativní těhotenský test: Hook Efekt

Fenomén známý jako Hook efekt (46) vyhodnocuje imunologické testy falešně negativně, přestože posuzovaný vzorek obsahuje sledovanou látku a konečný odečet výsledku by měl být registrován jako pozitivní. Jde o imunologický jev, jehož příčinou může být narušení imunitních procesů, kdy má antigen nebo protilátka vysokou koncentraci, případně sledovaný vzorek obsahuje varianty sledované látky, pro které není test stavěn. Ačkoliv je „Hook efekt“ vzácný, jedná se o důležitý jev. Tendence ztrácet skepsi, přestože

imunochromatografické testy nejsou 100% spolehlivé (47), přináší prostor pro falešně negativní výsledky a je proto nutné být s interpretací výsledku obezřetní.

Studium hCG a jeho vazby na důkaz těhotenství odhalily možnou přítomnost variant hCG v moči pacientky. Močové těhotenské soupravy jsou postaveny na principu reakce s beta podjednotkou hCG, a to díky její specifitě právě pro hCG, podjednotka alfa je společným znakem glykoproteinů a proto by test postaveny na její detekce nevyhodnocoval výlučně hCG, nýbrž Folikulostimulační hormon (FSH), Luteinizačního hormonu (LH) a hormony stimulující štítnou žlázu (TSH) (48). Studie ukazují, že falešně převládající výsledky u těhotných žen, mohou být způsobeny přítomností odlišné varianty hCG – intaktního hCG, volného beta řetězce, fragmenty beta fragmentů, H-hCG (hyperglykosylovaného hCG) a jiné. (48) (49) (50). „Hook efekt“ můžeme uvést na příkladu studie Butler SA a spol, která došla k závěru, že 9 z 15 běžných těhotenských testů nedetekovaly H-hCG tak úspěšně jako inaktivní hCG (51). Vytvoření imunokomplexů, na kterých je test postaven, není v tomto případě možné, vytvářejí se jiné imunokomplexy, ty ale neumožňují vizuálně pozitivní výsledek. (46). Při opakovaném provádění testu napomáhá odhalení „Hook efektu“ vzorek moči zředit, díky čemuž dochází k vyrovnání nadbytku antigenů. (46). Falešně negativní výsledek podléhá i POCT diagnostická metoda: 1,6 % (včetně vícečetného mimoděložního těhotenství) a 3,6 % u žen s bolestí břicha či vaginálním krvácením (39)



Obrázek 10 Nalevo: Funkční těhotenský test. Napravo: Test podléhající Hook efektu – falešně negativní vyhodnocení testu

## 5. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Moderní doba nám přináší mnohé metody a způsoby, jimiž máme možnost si zpříjemnit a urychlit proces aktivit a zkrátit dobu čekání na prakticky cokoliv, jak už bylo víckrát zmíněno, mezi tuto širokou škálu možností patří i diagnostika těhotenství, o tom jak se vyvíjela možnost zjistit, zdali se sexuálně aktivnímu páru povedlo počnout potomka pojednávají předcházející kapitoly (3). V této kapitole se zaměříme na laboratorní možnosti vyhodnocení, na jejich interpretaci, na invazivní i neinvazivní vyšetření a v poslední řadě na možné budoucí procesy diagnostiky.

### 5.1. Intaktní lidský chodirogonadotropin v séru pomocí ECL

Vyhodnocení těhotenství na počátku 4. týdne provádí PLM IKEM, principem stanovení je přítomnost intaktní hCG + beta podjednotky v séru. Sekrece intaktní hCG podjednotky je zajištěna buňkami trofoblastu ve fázi udržení funkce *corpus luteum*, spolu s nimi je uvolněno menší množství volných podjednotek. Citlivost pozitivního výsledku testu, fyziologické gravidity, je od cut off 10 IU/l v séru (27). Test dále monitoruje hned několik parametrů vycházející z hodnoty hCG:

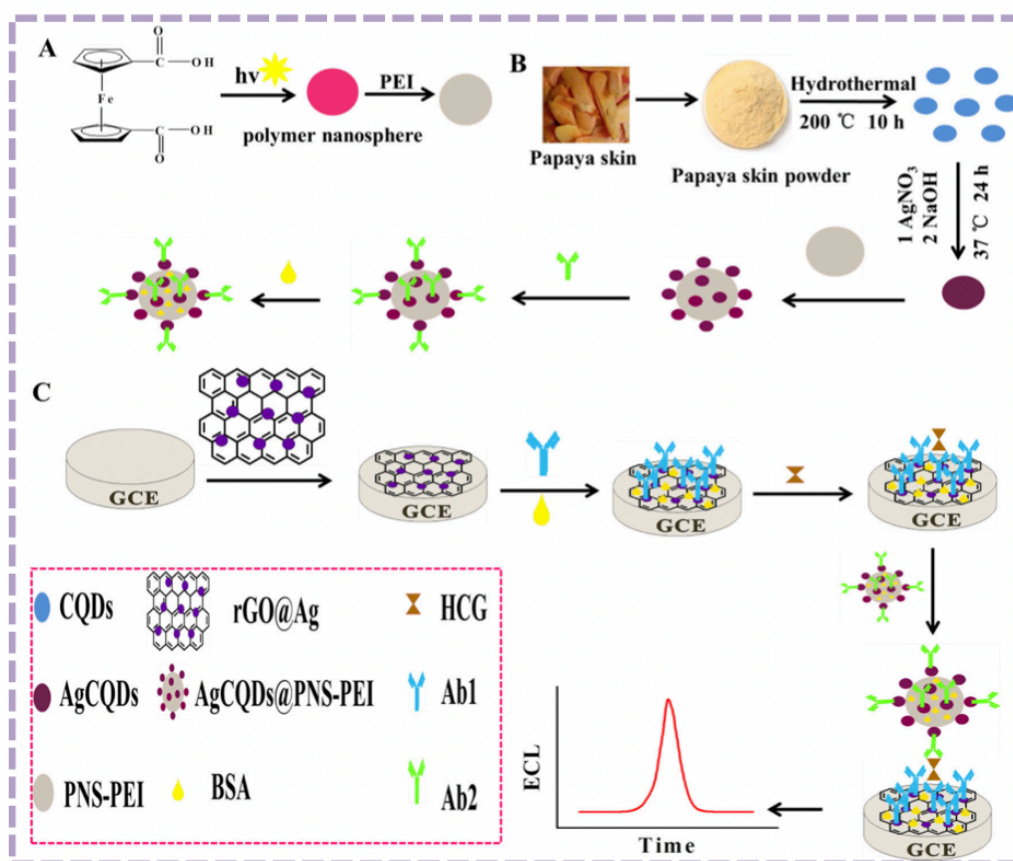
- patologickou graviditu – ektopické, *mimoděložní*, těhotenství nebo hrozící potrat,
- znalost koncentrace hCG slouží k posouzení gestačního věku,
- dle kvantitativní hodnoty hCG mnohočetnost gravidity,
- screening vrozených vývojových vad,
- intaktní hCG + beta podjednotku jako tumor marker, diagnostika i monitorování léčby.

Principem stanovení je metoda měření patřící do skupiny luminiscenčních metod: elektrochemiluminiscence

Jedná se o metodu založenou na excitaci elektronů sledované látky na elektrické anodě (*elektrochemiluminiscence*) iniciovanou vhodně zvolenou chemickou reakcí (*elektrochemiluminiscence*), kde sledovaným parametrem je množství emitovaného světla, fotonů, při oné excitaci a po dopadu na měřící senzor (*elektrochemiluminiscence*).

**Elektrochemiluminiscence (ECL)** má hned několik pozitiv, díky kterým jsou analýzy pomocí ECL hojně využívána biochemickými i klinickými zařízeními po celém světě. Oproti konvenčním optickým technikám má ECL nesporné výhody ve vysoké citlivosti, dobré specifitě, nízkým nákladům a nízkému šumu pozadí. Díky rozmanitosti aktivních komponent a reakcí má ECL mnoho využití v praxi, uplatňuje se při identifikaci molekul, v klinické diagnóze nebo při detekci chemikálii. (52; 53)

### 5.1.1. Elektrochemiluminiscenční imunanalýzy hCG pomocí stříbrných uhlíkových kvantových teček a funkcionalizovaných polymerních nanosfér



Obrázek 11 Princip ECL s ultrasenzitivním imunosenzorem AgCQDs@PNS-PEI

Elektrochemiluminiscenční (ECL) imunosenzor využívající jako sondu nanokompozit AgCQDs@PNS-PEI pro detekci hCG má vynikající selektivitu, dobrou reprodukovatelnost a vysokou stabilitu (54). Studie uvádí výrobu ultrasenzitivního imunosenzoru ECL pomocí



uhlíkové kvantové tečky (CQD) syntetizované slupkou papáji v kombinaci s ionty stříbra za vzniku nanokompozitu stříbra nabitého CQD (AgCQD). Polymerní nanokuličky (PNS) byly vytvořeny pomocí nekonečného koordinačního polymeru kyseliny ferocendikarboxylové a použity jako nosiče pro naplnění AgCQD. Připravený AgCQDs@PNS-PEI má dobrou biokompatibilitu a elektrickou vodivost a lze jej použít jako matici pro imobilizaci sekundární protilátky. (54)

Testy, jež probíhaly se třemi vzorky ženského séra (30letá, 35letá a 37letá), které poskytla Guilin Fifth People's Hospital, o objemu 3 ml byly smíchány s hCG o třech koncentracích (10.0, 25.0, 157 mIU/ml). Vzorky nebyly pro účely měření ředěny. Výsledky studie viz Tabulka 5 Výsledky studie o detekci hCG pomocí ELC magnetické imunoanalýzy v nemocnici (použito z původní studie). Výtěžnosti a relativní směrodatné odchylky jsou v rozmezí od 97,2 do 102 % a 1,3 až 2,6 %, to ukazuje, že tyto imunosenzory jsou dostatečně citlivou metodu pro detekci ke stanovení hCG ve vzorcích séra (54).

Tabulka 5 Výsledky studie o detekci hCG pomocí ELC magnetické imunoanalýzy v nemocnici (použito z původní studie (54))

SERUM SAMPLE	ORIGINAL (MIU·ML <sup>-1</sup> )	ADDED (MIU·ML <sup>-1</sup> )	FOUND (MIU·ML <sup>-1</sup> )	RECOVERY (%)	RSD (%)	HOSPITAL VALUE (MIU·ML <sup>-1</sup> )
1	10.1±0.23	10.0	20.3±0.53	102	1.7	10.0
2	24.7±0.71	25.0	49.0±0.83	97.2	2.6	25.0
3	156.8±2.10	157.0	313.6±4.1	99.9	1.3	150

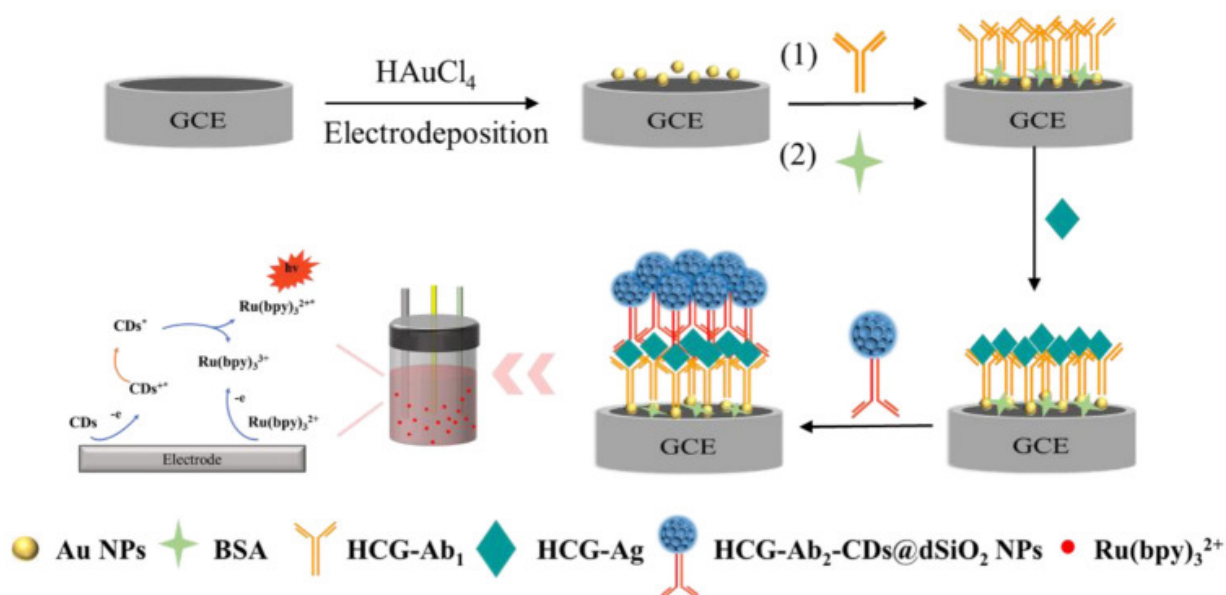
Studie také uvádí detekční limit hCG je 0,33 µIU/ml s lineárním rozsahem 0.00100 to 500 mIU/ml (za optimálních podmínek) (54). Tato metoda měření v porovnání s jinými

metodami viz *Obrázek 12 Srovnání metod pro detekci hCG (požito z původní studie (38))* má více než 10x nižší detekční limit a rozsah detekce hCG je rozsáhlejší než uváděné metody. (54)

Detection method	Nanomaterial	Linear range (mIU mL <sup>-1</sup> )	Detection limit (mIU mL <sup>-1</sup> )	Ref.
Colorimetric immunoassay	MnO <sub>2</sub> nanorods	0.5–400	0.36	[3]
Differential pulse voltammetry	AgNPs/graphene-IL-Chit nanocomposite	0.0212–530	0.0066	[4]
Surface-enhanced Raman scattering	HAuCl <sub>4</sub> -hCG- peptide probe-AgNPs-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.5–200	0.18	[6]
Chemiluminescence resonance energy transfer	Magnetic nanoparticles-graphene	0.1–10	0.06	[8]
Linear-sweep voltammetry	AgNPs/peptide	1–200	0.4	[43]
Cyclic voltammetry	Pt-Au alloy nanotube	25–400	12	[44]
Electrochemiluminescence immunoassay		0–3		[45]
Colorimetric immunoassay	Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-coated gold nanoparticles	1250–10,000	1250	[46]
Electrochemiluminescence immunosensor	Ru-Nafion@TiO <sub>2</sub> composite nanoparticles	0.02–25	0.007	[47]
Electrochemiluminescence immunosensor	Au star@BSA-luminol nanocomposites	0.00100–500	0.0003	[48]
Electrochemiluminescence immunosensor	AgCQDs@PNS-PEI composites	0.00100–500	0.00033	This work

*Obrázek 12 Srovnání metod pro detekci hCG (požito z původní studie (38))*

## 5.2. Elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy hCG pomocí sendvičového imunosenzoru s CDs@dSiO<sub>2</sub> nanočásticemi



*Obrázek 13 Princip ECL pomocí sendvičového imunosenzoru s CDs@dSiO<sub>2</sub> nanočásticemi*

Ve vysoce účinném systému ECL tvoří nezbytnou část mechanické konstrukce koreaktanty, tradiční koreaktanty jsou ale mnohdy toxické, nová studie popisuje syntézu málo toxických, ekologicky šetrných a stále účinných koreaktantů  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  a navrhuje imunosenzor ECL s vynikající stabilitou a selektivitou. (55).  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  a jeho deriváty mají stabilní luminiscence, nízké dávkování, transparentní mechanismus luminiscence, obnovitelnost a přizpůsobivost za různých pH podmínek (55; 56; 57), díky čemuž se stává používaným při vývoji nových ECL ko-reaktantovým systémů v analytické vědě.

*Prvním krokem elektrodepozice zlatých nanočástic (Au NP) na elektrody ze skelného uhlíku (GCE, 3 mm) a hCG-Ab1 byl imobilizován na Au NP kovalentní vazbou Au-S a po specifickém zachycení hCG, byl kombinován s hCG-Ab2 modifikovanými  $\text{CDs}@d\text{SiO}_2$  NP (hCG-Ab2- $\text{CDs}@d\text{SiO}_2$  NP). V tomto ECL systému byl  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  stejnoměrně dispergován v roztoku pufru a  $\text{CDs}@d\text{SiO}_2$  NP byly použity jako nanosonda a také nový koreaktant  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . (55)*

Lineární rozsah pro ultra senzitivní detekci dosahuje 0,0005 mIU/ml až 500 mIU/ml při detekčním limitu 0,00019 mIU/ml. (55) Vzorek fyziologického séra byl zředěn 10 000krát PBS, měření signálu ECL bylo prováděno při koncentracích 5 mIU/ml, 15 mIU/ml a 25 mIU/ml antigenu a koncentrace hCG bylo následně vypočteno pomocí lineární rovnice regrese. Výťažnost z postupu byla 100 – 100,1 % a relativní směrodatná odchylka byla méně než 6,7 % viz

SAMPLE	INITIALN HUMAN SERUM	ADDED (MIU·ML-1)	MEASURED (MIU·ML-1)	AVERAGE (%)	RSD (%)	HOSPITAL (N=3,%)
1	<LOD	5.0	4,48	5,72	4,4	100,1
			4,87			
			4,87			
2	<LOD	15.0	13,36	14,15	6,7	99,94
			13,88			

			15,20			
<b>3</b>	<LOD	25.0	24,4 25,87 26,02	25,43	2,3	100

Tabulka 6 Výsledky analýzy detekce hCG pomocí ECL s CDs@dSiO<sub>2</sub> nanočásticemi .Studie přichází se závěrem dobré biokompatibility a dispergovatelnosti CD a tím očekávám, že systém ECL Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> - CDs@dSiO<sub>2</sub> bude slibný pro biologické snímání. (55)

Tabulka 7 Porovnání diagnostických metod pro detekci hCG uvádí diagnostická porovnání metod pro detekci hCG ze studie Chen a spol (2023) (55), kde je zaznamenáno porovnání vlastních výsledků detekčního limitu s výsledky detekčních limitů jiných detekčních metod, do metod k porovnání byla zařazena i studie Qin a spol (2020) (54), o které pojednává kapitola 5.1.1. Výsledkem porovnání je, že nejcitlivější detekční limit má studie, která s porovnáním přichází, tedy největší citlivost můžeme naléznout u metody detekce ECL pomocí sendvičového imunosenzoru s CDs@dSiO<sub>2</sub> nanočásticemi (55).

Tabulka 6 Výsledky analýzy detekce hCG pomocí ECL s CDs@dSiO<sub>2</sub> nanočásticemi

<b>SAMPLE</b>	<b>INITIALN HUMAN SERUM</b>	<b>ADDED (MIU·ML<sup>-1</sup>)</b>	<b>MEASURED (MIU·ML<sup>-1</sup>)</b>	<b>AVERAGE (%)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>HOSPITAL (N=3,%)</b>
<b>1</b>	<LOD	5.0	4,48 4,87 4,87	5,72	4,4	100,1
<b>2</b>	<LOD	15.0	13,36 13,88 15,20	14,15	6,7	99,94
<b>3</b>	<LOD	25.0	24,4 25,87 26,02	25,43	2,3	100

Tabulka 7 Porovnání diagnostických metod pro detekci hCG (55)

<b>DETEKČNÍ METODA</b>	<b>LINEÁRNÍ REGRESE</b>	<b>DETEKČNÍ LIMIT</b>
Imunochromatické testy	0,5±500 mIU/ml	0,22 mIU/ml
Povrchově zesílený Ramanův rozptyl	0,5±200 mIU/ml	0,18 mIU/ml
Chemiluminiscence	0,1±10 mIU/ml	0,06 mIU/ml
Elektrochemiluminiscence	0,001±500 mIU/ml	0,0003 mIU/ml
Elektrochemiluminiscence	0,001±500 mIU/ml	0,00033 mIU/ml *
Elektrochemiluminiscence	0,0005±500 mIU/ml	0,00019 mIU/ml **

\* (54) Elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy hCG pomocí stříbrných uhlíkových kvantových teček a funkcionalizovaných polymerních nanosfér

\*\* (55) Elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy hCG pomocí sendvičového imunosenzoru s CDs@dSiO<sub>2</sub> nanočásticemi

## 6. MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY

Detekce těhotenství by do budoucna mohla mimo jiné probíhat pomocí diagnózy volného DNA plodu v krvi matky. Testy pro takovýto typ vzorku trh již nabízí, nicméně se jedná o testy pro detekci genetických vad. Principem testu NIPT (Noninvasive prenatal testing) je sledování chromozomu plodu v krvi matky, tak abychom byli schopni přiřadit daný chromozom k původnímu chromozomu a následně posoudit, zdali je v nadbytku či nedostatku a tím odhalit genetické vady. NIPT jako spolehlivý test umožňuje odhalit Downův syndrom, Edwardsův syndrom, Patauův syndrom a vady vázané na pohlavní chromozómy X a Y. Po pozitivním nálezu následuje invazivní genetické vyšetření jako je odběr plodové vody (AMC) nebo odběr choriových klků (CVS). Teoretické vyšetření lze provádět po dosažení 8. týdne těhotenství běžným odběrem žilní krve matky. Praktické využití testu následuje pro provedení screeningu v prvním trimestru, po dosažení 11. týdne (58)

## 7. ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo popsat, jakým způsobem a jakými principy probíhá diagnostika těhotenství během počátečních dnů těhotenství, jaký je aktuální stav poznání pro diagnostiku, jaké metody jsou používány i jaké by mohly být trendy do budoucna.

Markerem využívaným pro diagnostické účely těhotenství je lidský choriogonadotropin (hCG). Důvod využívání hCG vyplývá z jeho místa produkce, kterým je během těhotenství syncytiotroblast placenty, což koreluje s jeho specifitou k těhotenství.

Jedná se o hormon ze skupiny glykoproteinů (Choriogonadotropin (hCG) Luteinizační hormon (LH), Folikulostimulační hormon (FSH), tyreotropní hormon (TSH)), hormony jsou tvořeny dvěma řetězci:  $\alpha$  – řetězec a  $\beta$ -řetězec. Společný řetězec utváří  $\alpha$  – řetězec, zatímco  $\beta$ -řetěz nese biologickou specifitu glykoproteinových hormonů. Po implantaci blastocytu se hCG v krvi objevuje kolem 8.-10. dne po oplození, v moči lze hCG zaznamenat v podobném časovém rozmezí. Citlivé těhotenské testy, pro samovyšetření, jsou schopné detekovat hCG při jeho hladině 10 mIU/ml již pár dní před očekávanou menstruací, spolehlivějšího výsledku je možné dosáhnout den po očekávání menstruace při koncentraci hCG 25 mIU/ml. Mechanismy těhotenských testů se mohou lišit způsobem vyhodnocení, jako například pomocí proužků, křížku nebo pomocí digitálního displeje, přičemž princip detekce bývá převážně založen na chromatografické separaci látek v imunochromatografických testech. Principem těchto testů je interakce mezi antigenem a značenou specifickou protilátkou za tvorby imunokomplexu, který je dále vzlínáním unášen přes další části testovací membrány k oblasti pro vyvážení značeného imunokomplexu, kdy se odděluje značení, které vyváří v testovací zóně okem viditelnou značku a test je vyhodnocen jako pozitivní nález těhotenství. Pokud ale viditelná značka nevzniká, vzorek neobsahuje hCG a test je hodnocen jako negativní.

Laboratorní detekce může být prováděna pomocí elektrochemiluminiscence (ECL). Jedná se o metodu založenou na excitaci elektronů sledované látky na elektrické anodě iniciovanou vhodně zvolenou chemickou reakcí, kde sledovaným parametrem je množství emitovaného světla, fotonů, při oné excitaci a po dopadu na měřící senzor. Citlivost metody je při graviditě od 10 mIU/ml hCG v krvi. Studie pro citlivější detekci vynalezly revoluční



konstrukci ECL detekující hCG pomocí stříbrných uhlíkových kvantových teček a funkcionalizovaných polymerních nanosfér. S ultrasenzitivním imunosenzorem AgCQDs@PNS-PEI byly uvedené výsledky citlivosti 0,00033 mIU/ml s lineárním rozsahem 0.00100 to 500 mIU/ml. (54). S vyšší citlivostí přichází studie popisující konstrukční sestavení ECL pro detekci hCG pomocí sendvičového imunosenzoru s CDs@dSiO<sub>2</sub> nanočásticemi. Tato studie přichází s výsledky pro lineární rozsah od 0,0005 mIU/ml až 500 mIU/ml při detekčním limitu 0,00019 mIU/ml. (55)

Choriogonadotropin dále slouží jako marker pro sledování těhotenství, při fyziologickém průběhu se postupně hladina zvyšuje a maxima dosahuje kolem 10. týdne, poté klesá až do porodu plodu a vypuzení placenty. Hodnota nižší než je pro dané období fyziologická může značit mimoděložní těhotenství, hrozící potrat nebo mrtvý plod. Zvýšená hladina hCG slouží mimo těhotenství k zaznamenání některých druhů rakovin – Gestační trofoblastická nemoc (GTN), Germinativní tumory varlete.

V rámci trendů blízké budoucnosti by mohla být pro detekci těhotenství použita metoda ECL s vysokou citlivostí. Volba neinvazivní metody pro posouzení gravidity díky sledování volně cirkulujícího DNA plodu v krvi matky není prozatím možná, takováto metodika je zatím hudba budoucnosti. Přestože jsou těhotenství pro rodiče často „vymodlená“ a při volbě testu sahají pro co nejcitlivější test, není poptávka po laboratorně velmi citlivých testech dostatečná a za vysokou cenu výzkumu není ve vědecké sféře touha po inovaci. I přesto je možné, že budoucí matky budou změnu svého fyziologického stavu znát dříve než dnešní budoucí rodičky. Prozatím zůstává nejpoužívanějším markerem hCG.

## CITOVANÁ LITERATURA

1. **Trojan, Stanislav a Scheiber, Michael.** *Knižní atlas biologie člověka: + 430 modelových otázek k přijímacím zkouškám na medicínu + 100 obrazových podkladů k opakování a procvičování.* Praha : Scientia, 2007. 978-80-86960-11-1.
2. **Health, UCSF.** OBSTETRICS & GYNECOLOGY Pregnancy. *UCSF Health* . [Online] The Regents of The University of California . [Cited: únor 27, 2022.] <https://www.ucsfhealth.org/conditions/pregnancy/trimesters>.
3. **Stanislav Trojan, Michael Schreiber.** *Knižní atlas biologie člověka: + 430 modelových otázek k přijímacím zkouškám na medicínu + 100 obrazových podkladů k opakování a procvičování.* Praha : Scientia , 2007. 80-86960-11-0.
4. **Britannica, The Editors of Encyclopaedia.** sex chromosome. *Encyclopedia Britannica*. [Online] Leden 24, 2023. [Cited: březen 10, 2023.] <https://www.britannica.com/science/sex-chromosome>.
5. **Otomar, Kittnar a kolektiv.** *Lékařská fyziologie.* Praha : Grada Publishing, 2020. 978-80-247-1963-4.
6. **Radomír, Čihák.** *Anatomie.* Praha : Grada, 2001. 80-7169-970-5.
7. **Wikipedia.** Těhotenství. *Wikipedie*. [Online] Wikimedia Foundation, 3. 3 2023. [Citace: 10. 3 2023.] <https://cs.wikipedia.org/wiki/Těhotenstv%C3%AD>.
8. **Wilhelmová, Radka a kolektiv.** MUNI MED. *Vývoj placenty* . [Online] Ústav zdravotnických věd, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, © 2021. [Citace: 10. 3 2023.] [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/ps20/porodni\\_asistence/web/pages/02\\_06\\_vyvoj\\_placenty.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/ps20/porodni_asistence/web/pages/02_06_vyvoj_placenty.html).

9. **Wikiskripta.** Vývoj pupečníku a placenty. *WikiSkripta*. [Online] Wikimedia Foundation, 25. prosinec 2021. [Citace: 21. únor 2022.] [https://www.wikiskripta.eu/w/Vývoj\\_pupečn%C3%ADku\\_a\\_placenty](https://www.wikiskripta.eu/w/Vývoj_pupečn%C3%ADku_a_placenty).
10. **ZOBAN, Petr.** *Neonatologický edukační program*. Praha : Česká neonatologická společnost, 1996. kroužkovýblok.
11. **Betz, Danielle and Fane, Kathleen.** Human Chorionic Gonadotropin. *StatPearls*. [Online] StatPearls Publishing, srpen 8, 2022. [Cited: duben 30, 2023.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532950/>.
12. *Biochemical discrimination of pathologic pregnancy from early, normal intrauterine gestation in symptomatic patients.* **Stewart, B. K., Nazar-Stewart, V., & Toivola, B.** 103, s.l. : American journal of clinical pathology, 1995, Vol. 4, pp. 386–390. 10.1093/ajcp/103.4.386.
13. *Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy.* **Wilcox, A. J., Baird, D. D., & Weinberg, C. R.** s.l. : The New England journal of medicine, 1999, Vol. 340, pp. 1796–1799. 10.1056/NEJM199906103402304.
14. **Johnson , Sarah R, et al.** Levels of urinary human chorionic gonadotrophin (hCG) following conception and variability of menstrual cycle length in a cohort of women attempting to conceive. *Current medical research and opinion*. Issue 3 , 2009, 25, pp. 741-748.
15. **C. Gnoth, S. Johnson.** Strips of Hope: Accuracy of Home Pregnancy Tests and New Developments. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2014, Vol. 74, 7, pp. 661–669.
16. **Kelley, Kristin.** The Aschheim-Zondek Test for Pregnancy . *The Embryo Project Encyclopedia* . [Online] září 2010. [Cited: duben 14, 2023.] <https://embryo.asu.edu/pages/aschheim-zondek-test-pregnancy>.
17. **Office of NIH History and Stetten Museum.** A Thin Blue Line: The History of the Pregnancy Test Kit. *National Institutes of Health*. [Online] Office of NIH History and Stetten

Museum, 2003. [Cited: duben 29, 2023.]  
<https://history.nih.gov/display/history/Pregnancy+Test+Timeline>.

18. *Development of the home pregnancy test*. **Vaitukaitis, Judith L**. 1038, s.l. : Annals of the New York Academy of Sciences, 2004, pp. 220–222. 10.1196/annals.1315.030.

19. **Cole, Laurence A**. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *ResearchGate*. [Online] srpen 2010.  
[https://www.researchgate.net/publication/45827182\\_Cole\\_LABiological\\_functions\\_of\\_hCG\\_and\\_hCG-related\\_molecules\\_Reprod\\_Biol\\_Endocrinol\\_8\\_102](https://www.researchgate.net/publication/45827182_Cole_LABiological_functions_of_hCG_and_hCG-related_molecules_Reprod_Biol_Endocrinol_8_102).

20. —. hCG, the wonder of today's science. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. Březen 28, 2012, Vol. 24, 10.

21. **Canfield, R. E., O'Connor, J. F., Birken, S., Krichevsky, A., & Wilcox, A. J**. Development of an assay for a biomarker of pregnancy and early fetal loss. Environmental health perspectives. *Environmental health perspectives*. 1987, 74, pp. 57–66.

22. *Preparation and characterization of new WHO reference reagents for human chorionic gonadotropin and metabolites*. **Birken, S., Berger, P., Bidart, J. M., Weber, M., Bristow, A., Norman, R., Sturgeon, C., & Stenman, U. H**. 49, místo neznámé : Clinical chemistry, 2003, stránky 144–154. 10.1373/49.1.144.

23. *Early pregnancy human chorionic gonadotropin (hCG) isoforms measured by an immunometric assay for choriocarcinoma-like hCG*. **Kovalevskaya, G., Birken, S., Kakuma, T., & O'Connor, J. F**. 161, místo neznámé : The Journal of endocrinology, 1. duben 1999, stránky 99–106. 10.1677/joe.0.1610099.

24. *Immunological analysis of epitopes on hCG*. **Torben Lund, Peter J. Delves**. 3 (2), s.l. : the official journal of the Society for the Study of Fertility, 1998, pp. 71-76. 1470-1626.

25. **Laub, Jennissen**. Identification of the anthelix motif in the TGF- $\beta$  superfamily by molecular 3D-Rapid Prototyping . *Wiley Oline Library* . [Online] leden 2004. [Cited: duben 24, 2023.] <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mawe.200300715>.

26. *Human chorionic gonadotropin testing for early pregnancy viability and complications.* **Davies, S., Byrn, F., Cole, L. A.** 23 (2), s.l. : Clinics in Laboratory Medicine, 2003. 10.1016/s0272-2712(03)00026-x.
27. **Lothar, Thomas.** *Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results.* Frankfurt : TH-Books, 1998. 3-9805215-4-0.
28. **J.E.P., Autorský kolektiv webu České onkologické společnosti ČLS.** *GESTAČNÍ TROFOBLASTICKÁ NEMOC* . s.l. : Linkos - Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně, © 2023. 2570-8791.
29. *Diagnosis and management of gestational trophoblastic disease: 2021 update.* **Ngan, H. Y. S., Seckl, M. J., Berkowitz, R. S., Xiang, Y., Golfier, F., Sekharan, P. K., Lurain, J. R., & Massuger, L.** 155, s.l. : International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics, říjen 2021, Issue S1, pp. 86–93.
30. *Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole.* **Lurain, John R.** 203(6), s.l. : American journal of obstetrics and gynecology, 2010, pp. 531–539. 10.1016/j.ajog.2010.06.073.
31. *Genetics of gestational trophoblastic disease.* . **Fisher, R A a Maher, G J.** 21, místo neznámé : Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2021.
32. **Tyssowski, Kelsey.** Pee is for Pregnant: The history and science of urine-based pregnancy tests. *Harvard university* . [Online] 31. srpen 2018. [Citace: 5. prosinec 2022.] <https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2018/pee-pregnant-history-science-urine-based-pregnancy-tests/>.
33. **Andrews, Robin.** Onions In Vaginas: The Strange History Of How Doctors Used To Test For Pregnancy. *IFLSCIENCE*. [Online] listopad 10, 2016. [Cited: prosinec 5, 2022.] <https://www.iflscience.com/bizarre-outlandish-history-pregnancy-tests0-31886>.

34. *New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin.* **Cole, Laurence A.** 7,8, s.l. : Reproductive biology and endocrinology : RB&E, Leden 26, 2009. 10.1186/1477-7827-7-8.
35. **Sobčáková, Mgr. Eubica.** BENU lékárna . *KDY SI UDEĚLAT TĚHOTENSKÝ TEST?* [Online] BENU , 11. listopad 2019. [Citace: 30. listopad 2022.] <https://www.benu.cz/kdy-si-udelat-tehotensky-test#toc-jak-dlouho-po-styku-si-udelat-tehotensky-test>.
36. *Recommendations for validation testing of home pregnancy tests (HPTs) in Europ.* **Sturgeon, C., Butler, S. A., Gould, F., Johnson, S., Rowlands, S., Stenman, U. H., & Grenache, D. G.** 59, s.l. : Clinical chemistry and laboratory medicine, online publication. , 2021, Clinical chemistry and laboratory medicine (CCLM), pp. 823-835. 10.1515/cclm-2020-1523.
37. *False negative point-of-care urine pregnancy tests in an urban academic emergency department: a retrospective cohort study.* **Kleinschmidt, S., Dugas, J. N., Nelson, K. P., & Feldman, J. A.** 2 (3), 2021. 10.1002/emp2.12427.
38. *Recommendations for validation testing of home pregnancy tests (HPTs) in Europe.* **Catharine, Sturgeon , et al.** 59, s.l. : Clinical chemistry and laboratory medicine, 2021. 10.1515/cclm-2020-1523..
39. *False negative point-of-care urine pregnancy tests in an urban academic emergency department: a retrospective cohort study.* **Kleinschmidt, Sarah, et al.** s.l. : Journal of the American College of Emergency Physicians open, 2021, Vol. 2 (3). 10.1002/emp2.12427.
40. **Pejic, Wendy a Argáez, Charlene .** Point-of-Care Urine Pregnancy Screening in the Emergency Department: Diagnostic Accuracy, Clinical Utility, and Guidelines. *CADTH | Canada's Drug and Health Technology Agency.* [Online] prosinec 2017. [Citace: 18. květen 2023.] <https://www.cadth.ca/point-care-urine-pregnancy-screening-emergency-department-diagnostic-accuracy-clinical-utility-and>.
41. **Seifert, Bohumil, a další.** *POCT METODY.* Praha : Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, 2020. 978-80-88280-20-0.

42. **Marcela Slováková, Zuzana Bílková, Lucie Korecká.** *Vybraná laboratorní cvičení z imunoanalytických metod.* Pardubice : Univerzita Pardubice, 2020. 978-80-7560-310-4.
43. **Benjamin J. Cowsill, Xiubo Zhao, Thomas A. Waigh, Saji Eapen a spol.** How do pregnancy tests work? *ACS Publications* . [Online] Langmuir, Červen 2014. [Citace: 28. únor 2023.] <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/la4036166#>.
44. *Accuracy of a home-based device for giving an early estimate of pregnancy duration compared with reference methods.* **Johnson, S. R., Godbert, S., Perry, P., Parsons, P., Roberts, L., Buchanan, P., Larsen, J., Alonzo, T. A., & Zinaman, M.** 100, 27. září 2013, *Fertility and sterility*, stránky 1635-1641.
45. **Max, Dr.** Dr. Max. [Online] [Citace: 7. prosinec 2022.] [https://www.drmax.cz/vitamin-station-rychltest-tehotensky-krevni-test-1-ks?gclid=Cj0KCQiAkMGcBhCSARIsAIW6d0BsXqaF77dpAZqydAB-GzpAKABCDS5yLmP2wkb3m19MFSPmvARxCYMaAhXHEALw\\_wcB](https://www.drmax.cz/vitamin-station-rychltest-tehotensky-krevni-test-1-ks?gclid=Cj0KCQiAkMGcBhCSARIsAIW6d0BsXqaF77dpAZqydAB-GzpAKABCDS5yLmP2wkb3m19MFSPmvARxCYMaAhXHEALw_wcB).
46. **Shista Priyadarshini, Sheela Prabhu.** False Negative Urine Pregnancy Test: Hook Effect Revealed. *PubMed* . [Online] březen 2, 2022. [Cited: duben 14, 2023.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8971111/>.
47. **LAZARENKO, Gerald C., Cathy DOBSON, Rosemarie ENOKSON and Rollin BRAN.** Accuracy and speed of urine pregnancy tests done in the emergency department: A prospective study. *Canadian university press.* [Online] *Canadian Journal of Emergency Medicine*, 21. květen 2015. <https://www.cambridge.org/core/journals/canadian-journal-of-emergency-medicine/article/accuracy-and-speed-of-urine-pregnancy-tests-done-in-the-emergency-department-a-prospective-study/C154FB7CAE1CA1D9E69087ED50EA07C8.10.1017/S1481803500005790>.
48. **Richard T Griffey, Caleb J Trent, Rebecca A Bavolek, Jacob B Keeperman, Christopher Sampson, Robert F Poirier.** "Hook-like effect" causes false-negative point-of-care urine pregnancy testing in emergency patients. *PubMed*. [Online] Leden 2013. [Citace: 14. Duben 2023.] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21835572/>.

49. **Butler SA, Khanlian SA, Cole LA.** Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices. *PubMed*. [Online] Prosinec 2001. [Citace: 14. Duben 2023.] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11719477/>.
50. **Robert D Nerenz, Ann M Gronowski.** Qualitative Point-of-Care Human Chorionic Gonadotropin Testing: Can We Defuse This Ticking Time Bomb? *Clinical Chemistry* . [Online] OXFORD ACADEMIC, Březen 1, 2015. [Cited: Duben 14, 2023.] <https://academic.oup.com/clinchem/article/61/3/483/5611352>.
51. **Butler SA, Khanlian SA, Cole LA.** Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices. *PubMed*. [Online] prosinec 2001. [Cited: duben 14, 2023.] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11719477/>.
52. *Recent Progress in Electrochemiluminescence Sensing and Imaging.* **Cheng Ma, Yue Cao, Xiaodan Gou, et al.** 92, s.l. : American Chemical Society, 2020, Analytical Chemistry , Vol. 1, pp. 431–454. 10.1021/acs.analchem.9b04947.
53. **AL Chen, XY Wang, Zhang Q, Bao N, Ding SN.** Sandwich-Type Electrochemiluminescence Immunosensor Based on CDs@dSiO<sub>2</sub> Nanoparticles as Nanoprobe and Co-Reactant. *PumMed Central*. [Online] Leden 13, 2023. [Cited: květen 10 , 2023.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9856027/>.
54. **Qin, D., Jiang, X., Mo, G. et al.** Electrochemiluminescence immunoassay of human chorionic gonadotropin using silver carbon quantum dots and functionalized polymer nanospheres. *Microchimica Acta*. 2020, Sv. 187, 482.
55. *Sandwich-Type Electrochemiluminescence Immunosensor Based on CDs@dSiO<sub>2</sub> Nanoparticles as Nanoprobe and Co-Reactant.* **Chen, A. L., Wang, X. Y., Zhang, Q., Bao, N., & Ding, S. N.** 13 (1), s.l. : Biosensors, 2023. 10.3390/bios13010133.
56. *A novel electrochemiluminescence immunosensor based on functional  $\beta$ -cyclodextrin-ferrocene host-guest complex with multiple signal amplification.* **Xiyue Xie, Haijun Wang, Li Zhang, Yuting Liu, Yaqin Chai, Yali Yuan, Ruo Yuan.** 258, místo neznámé : Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, stránky 1146-1151. 10.1016/j.snb.2017.11.171.



57. *Electrochemiluminescence resonance energy transfer system between GNRs and Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>: Application in magnetic aptasensor for  $\beta$ -amyloid.* **Ke, H., Sha, H., Wang, Y., Guo, W., Zhang, X., Wang, Z., Huang, C., & Jia, N.** 100, místo neznámé : Biosensors & bioelectronics, 2018, stránky 266–273. 10.1016/j.bios.2017.09.017.

58. *Result of Prospective Validation of the Trisomy Test® for the Detection of Chromosomal Trisomies.* **Sekelska, Martina, et al.** 9 (4) , s.l. : Diagnostics (Basel) , 2019, Vol. 138. PMC6963324.