

**Identifikace nových potenciálních biomarkerů  
předčasného porodu v plodové vodě**

**Mgr. Petra Zedníková**

**2020**

**Univerzita Pardubice**

## Prohlášení autora

### Prohlašuji:

Tuto práci 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 21. srpna 2020

Petra Zedníková

## Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své rodině, Petrovi, Anežce a také svojí mamce za podporu a trpělivost především při dopisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat svým vedoucím, prof. Čeganovi a Vojtovi Tamborovi, PhD. za cenné rady a pomoc při práci. Můj dík také patří všem mým kolegům z CBV, především pak Majce a Kristýně. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat čtenářům této práce o to za schovávavost k používání některých anglických pojmů v textu práce, což je z hlediska nedostatků v české terminologii zatím nezbytné.

## **Anotace**

Předčasný porod, tedy porod před ukončeným 37. týdnem těhotenství představuje celosvětový problém (10 % dětí se ročně narodí předčasně). Je hlavním důvodem novorozenecké úmrtnosti a nemocnosti. V současné době nejsou dostupné vhodné predikční markery pro včasné odhalení rizika předčasného porodu. Cílem této práce je uvést základní přehled problematiky předčasného porodu, analyzovat vzorky plodových vod pomocí exploratorních proteomických metod a poskytnout možný panel dysregulovaných proteinů vhodných pro další studium. Tato studie porovnávající vzorky plodových vod od žen, které porodily předčasně s termínovými porody, odhalila 18 signifikantně dysregulovaných proteinů.

## **Klíčová slova**

předčasný porod, plodová voda, biomarkery, proteomika

## **Title**

Identification of new potential biomarkers of preterm birth in amniotic fluid

## **Annotation**

Preterm birth is the birth of a baby less than 37 weeks of gestational age. It accounts for the main reason for perinatal mortality and long-term morbidity. The preterm birth rate (around 10 %) is a worldwide complication. A reliable screening tool that could reduce the incidence by early diagnosis has not been found. The aim of this project is to summarize current knowledge about the preterm birth problematic, analyze samples of amniotic fluid using the proteomic shotgun accesses and show the list of potential predictive markers suitable for further investigation. The results of this case-cohort study of amniotic fluid samples showed 18 significantly dysregulated proteins.

## **Keywords**

preterm birth, amniotic fluid, biomarkers, proteomics

## Obsah

Seznam tabulek .....	7
Seznam obrázků .....	9
Seznam použitých zkratk v teoretické části.....	10
Úvod .....	13
<b>1. Předčasný porod .....</b>	<b>15</b>
1.1. Patofyziologie .....	16
1.2. Prenatální diagnostika.....	16
<b>2. Proteomické metody .....</b>	<b>20</b>
2.1. Separační techniky.....	24
2.2. Hmotnostní spektrometrie .....	26
2.2.1. Analýza proteinů pomocí MS.....	27
2.3. Identifikace a kvantifikace proteinů a peptidů pomocí MS.....	37
<b>3. Biomarkery předčasného porodu a proteomická MS analýza plodové vody .....</b>	<b>47</b>
<b>4. Experimentální část .....</b>	<b>53</b>
4.1. Charakterizace souboru pacientek.....	53
4.2. Materiál a metody .....	57
4.2.1. Příprava vzorků.....	57
4.2.2. Imunodeplece .....	58
4.2.3. Enzymatické štěpení a značení vzorků.....	62
4.2.4. Bazická frakcionace vzorků .....	69
4.2.5. LC-MS/MS analýza.....	72
4.3. Statistické zpracování dat, jejich identifikace a kvantifikace.....	77
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>78</b>
5.1. základní statistické vyhodnocení souboru pacientek.....	78
5.2. vyhodnocení stanovení celkového množství proteinů ve vzorkách metodou BCA .....	79
5.3. vyhodnocení imunodeplece .....	82

5.4.	identifikace proteinů na základě analýzy peptidů po LC-MS/MS analýze .....	83
5.5.	výpočet iTRAQ poměrů .....	84
5.6.	příprava základního datasetu .....	84
5.7.	filtrování dat .....	85
5.8.	imputace a normalizace dat .....	87
5.9.	statistické zpracování finálního datasetu.....	88
5.10.	vizualizace dat .....	88
6.	Diskuze .....	93
7.	Závěr .....	105
8.	Seznam použité literatury .....	106
9.	Přílohy .....	122

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Parametry pěti nejčastěji používaných hmotnostní analyzátorů udávaných výrobcí.	27
Tabulka 2: Významnost přesnosti určení hmoty u PMF na počet výsledných shod .....	39
Tabulka 3: Porovnání kvantitativních metod využívaných v proteomice .....	46
Tabulka 4: Seznam potenciálních markerů předčasného porodu získaných proteomickými metodami .....	50
Tabulka 5: Charakterizace souboru pacientek .....	54
Tabulka 6: Statistika souboru pacientek .....	56
Tabulka 7: Přehledová tabulka celkového množství proteinu ve vzorkách a objemy ke zpracování .....	59
Tabulka 8: Gradient metody pro imunodepleci vzorků .....	61
Tabulka 9: Přehledová tabulka pro přípravu vzorků ke štěpení .....	63
Tabulka 10: Značení vzorků pomocí iTRAQ značek .....	65
Tabulka 11: Výsledky MALDI měření – ověření štěpení a iTRAQ značení .....	67
Tabulka 12: Gradient metody pro bazickou LC analýzu vzorků. Metoda A 15 min pro analýzu blanku .....	70
Tabulka 13: Gradient metody pro bazickou LC analýzu vzorků. Metoda B 40 min pro analýzu vzorků a standardu CytC .....	70
Tabulka 14: Gradient metody pro finální LC-MS/MS analýzu blanků (35 min metoda) .....	74
Tabulka 15: Gradient metody pro finální LC-MS/MS analýzu CytC (60 min metoda) .....	75
Tabulka 16: Gradient metody pro finální LC-MS/MS analýzu vzorků (85 min metoda) .....	75
Tabulka 17: Parametry nastavení hmotnostního spektrometru Q Exactive plus při LC-MS/MS	76
Tabulka 18: Statistika souboru pacientek .....	79
Tabulka 19: Rozmístění vzorků a standardů v 96 jamkové destičce .....	80
Tabulka 20: Ukázka výsledků získaných z BCA analýzy testovacích vzorků .....	80
Tabulka 21: Přehled koncentrací celkového proteinu vzorků plodových vod v mg/ml .....	81
Tabulka 22: Průměrné počty identifikací na jeden multiplex po LC-MS/MS analýze .....	83
Tabulka 23: Podmínky přijetí či zamítnutí proteinu pro další zpracování na základě platných hodnot u příkladového proteinu XY .....	85
Tabulka 24: Podmínky přijetí či zamítnutí proteinu pro další zpracování na základě variačního koeficientu u příkladového proteinu XY .....	86

Tabulka 25: Finální přijetí či zamítnutí proteinu na základě splnění obou předchozích podmínek v alespoň 75 % obou skupin .....	87
Tabulka 26: Typy imputovaných dat dle parametru měření replikátů na příkladu 4 pacientů .....	87
Tabulka 27: Výsledky zpracování statisticky významných dat z proteomické studie .....	90
Tabulka 28: Seznam proteinů depletovaných pomocí MARS Hu-14 kolony a porovnání nejvíce zastoupených proteinů krevní plazmy a plodové vody .....	94



## Seznam obrázků

Obrázek 1: Porovnání top-down a bottom up přístupů v proteomice .....	22
Obrázek 2: Model vzniku iontů při ionizaci: (A) elektrosprej; (B) nanoelektrosprej .....	29
Obrázek 3: Schematické znázornění trojitého kvadrupólu QqQ .....	30
Obrázek 4: Analyzátoři typu iontové pasti: (A) 3D iontová past; (B) lineární iontová past .....	31
Obrázek 5: (A) Orbitrap a (B) analyzátoři iontové cyklotronové resonance s Fourierovou transformací .....	33
Obrázek 6: Schématické znázornění některých typů zapojení hmotnostních analyzátořů využívaných v proteomice .....	34
Obrázek 7: Princip fragmentace při tandemové hmotnostní spektrometrii .....	36
Obrázek 8: Schéma a nomenklatura fragmentace v kolizní cele podle místa štěpení vazby a pozice náboje .....	37
Obrázek 9: Tandemová hmotnostní spektrometrická analýza v DDA a DIA módu .....	38
Obrázek 10: Princip cílené proteomické analýzy na příkladu SRM/MRM .....	39
Obrázek 11: Kvantifikační metody pro hmotnostní spektrometrii .....	41
Obrázek 12: Princip značení pomocí izobarických značek .....	43
Obrázek 13: Schéma přípravy GIS a multiplexů .....	64
Obrázek 14: Porovnání UV záznamu po LC analýze multiplexů 2, 4, 9 a 16. ....	68
Obrázek 15: Chromatografický záznam bazické LC analýzy vzorků .....	71
Obrázek 16: Schéma pro kombinaci vzorků po bazické separaci .....	71
Obrázek 17: MS záznam kalibrantu v ESI + .....	73
Obrázek 18: UV/VIS chromatografický záznam imunodeplece .....	83
Obrázek 19: Schéma výpočtu iTRAQ poměrů z intenzit reporterových iontů.....	84
Obrázek 20: Procenta platných hodnot napříč triplikáty .....	85
Obrázek 21: Zobrazení variačního koeficientu mezi triplikáty .....	86
Obrázek 22: Zobrazení dat před a po normalizaci pomocí LOESS normalizace v programu R ...	88
Obrázek 23: Zpracování všech kvantifikovaných proteinů formou volcano grafu .....	89
Obrázek 24: Grafické znázornění statisticky významných proteinů .....	92
Obrázek 25: Porovnání počtu identifikací vzorků před a po imunodepleci .....	96
Obrázek 26: Porovnání počtu identifikací vzorků bez a po frakcionaci .....	98
Obrázek 27: Porovnání programu PD a MQ v množství získaných identifikací.....	99

## Seznam použitých zkratk v teoretické části

1 DE	Jednorozměrná gelová elektroforéza
2 DE	Dvourozměrná gelová elektroforéza
B/D-HPP	Biology/Disease Human Proteome Project
BMI	Body mass index
C-HPP	Chromosome-based Human Proteome Project
CID	Collision Induced Dissociation – ionizace indukovaná kolizní energií
CNBr	kyanobromid
CRH	Corticotrophin-Releasing Hormone – kortikotropin uvolňující hormon
CRP	C – Reaktivní Protein
DDA	Data-Dependent Analysis – analýza závislá na datech
DIA	Data-Independent Analysis – analýza nezávislá na datech
ECD	Electron Capture Dissociation – ionizace záchytem elektronů
ERLIC	Electrostatic Repulsion – Hydrophilic Interaction Chromatography – separace s využitím elektrostaticky odpuzovaných hydrofilních interakcí
ESI	Electro Spray Ionization – ionizace elektrosprejem
ETD	Electron Transfer Dissociation – ionizace přenosem elektronů
FIRS	Fetal Inflammatory Response Syndrome – systémové zánětlivé postižení plodu
fFN	fetální fibronektin

HCD	High Collision Induce Dissocaition – ionizace indukovaná vysokou kolizní energií
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – separace s využitím hydrofilních interakcí
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography – vysokotlaká kapalinová chromatografie
HSP70	Heat shot protein 70
ICAT	Isotope-Coded Affinity Tag – izotopově značená kotva
ICR	Ion Cyclotrone Resonance – Iontová cyklotronová rezonance
IGFBP	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1
IL-6	Interleukin 6
IMS	Ion Mobility Separation – separátor iontových mobilit
IT	Ion Trap – iontová past
iTRAQ/TMT	Isobaric Tags For Relative And Absolute Quantification/ Tandem Mass Tags – metody izobarického značení pro relativní a absolutní kvantifikaci
LC	Liquid chromatography – kapalinová chromatografie
LIT	Linear Ion Trap – lineární iontová past
<i>m/z</i>	poměr molekulární hmotností a náboje – měrná hmotnost
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – ionizace a desorpce z účasti matice
MS	Mass Spectrometry – hmotnostní spektrometr
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie

MudPit	Multidimensional Protein Identification Technology – multidimenzionální přístup pro identifikaci proteinů
PB	Preterm Birth – předčasný porod
PAMG – 1	Placental Alpha Microglobulin-1
PMF	Peptide Mass Fingerprinting – metoda otisku prstu
ppm	parts per million
pPROM	Preterm Premature Rupture Of Membranes – předtermínový předčasný odtok plodové vody
PTM	posttranslační modifikace
Q	Quadrupole – kvadrupólový analyzátor
RP	Reverse Phase – reverzní fáze
SAX	Strong Anion Exchange – výměna aniontů
SCX	Strong Cation Exchange – výměna kationtů
SELDI	Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization
SILAC	Stable Isotope Labeled Amino Acid In Cell Culture – izotopové značení stabilními izotopy v buněčných kulturách
SRM/MRM	Selected Reaction Monitoring/ Multiple Reaction Monitoring – cílené proteomické analýzy
SWATH	Sequential Window Acquisition Of All Theoretical Mass Spektra
TOF	Time Of Flight – analyzátor doby letu
UHPLC	Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography – ultravysokotlaká kapalinová chromatografie

## Úvod

Předčasný porod, definovaný jako porod před ukončením 37. týdne těhotenství, je jednou z hlavních příčin perinatální morbidity a mortality. Je spojován se 70–80 % perinatálních úmrtí a s více než polovinou dlouhodobé neonatální morbidity. Celosvětově se dle údajů z roku 2008 (a 2018 dle WHO<sup>1</sup>) předčasně narodí kolem 10 % dětí [1]. V Evropě je tato hranice celkově nižší mezi 6–9 %, v USA, Asii a Africe, ale i ve Velké Británii incidence dosahuje 12–16 % (údaje z roku 2014 dle WHO<sup>1</sup>) [1, 2]. V České republice se incidence předčasného porodu pohybovala mezi 6–7 %, poslední dobou se možná i vlivem zvýšení počtu umělých oplodnění zvyšuje a také zvyšujícího se věku matek prvorodiček, v roce 2017 dosahovala incidence předčasného porodu 7,8 % [3, 4].

Předčasný porod lze systematicky rozdělit na dvě skupiny. První skupinu tvoří předčasné porody indukované, kde je těhotenství ukončeno z důvodů závažných komplikací na straně matky, plodu či obou. Ukončení probíhá nejčastěji císařským řezem z důvodů preeklampsie (na straně matky) či intrauterinní růstové restrikce plodu. Indukované předčasné porody tvoří přibližně 25 % všech předčasných porodů. Druhou skupinou jsou spontánní předčasné porody, které zahrnují několik klinických forem a vzájemně se prolínají [5]. Této skupině, kam spadají předčasné porody s předčasným odtokem plodové vody a spontánní předčasné porody bude věnována tato práce. I přes fakt, že je předčasný porod multifaktoriální syndrom, jehož patofyziologie zatím nebyla zcela objasněna, je za základní patologický proces považován zánět [2]. Je-li zánětlivá odpověď přítomna i u plodu, je riziko následné postnatální morbidity ještě vyšší. V současné době probíhají rozsáhlé klinické studie biochemických markerů vhodných pro detekci předčasného porodu i zánětlivé odpovědi plodu, díky kterým by bylo možné začlenit do managementu těhotenství nové diagnostické a terapeutické přístupy a snížit incidenci či následky předčasného porodu [3].

Právě v této oblasti identifikace nových potenciálních markerů vyniká svými možnostmi proteomika, věda zabývající se studiem a analýzou proteinů. Proteomika je dynamicky se rozvíjející vědní obor, který usiluje o kvalitativní i kvantitativní zmapování proteinů, efektorových

---

<sup>1</sup> Staženo z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>

molekul organismu. Díky účinným metodám, a především spojení s hmotnostní spektrometrií, prokazuje obrovský potenciál při studiu mnoha fyziologických i patologických procesů a při diagnostice onemocnění, jako je např. syndrom předčasného porodu [6]. Tato práce shrnuje stručně proteomické metody využívané k identifikaci potenciální biomarkerů předčasného porodu z plodové vody. V experimentální části se pak věnuje přímé analýze plodové vody a přináší přehled potenciálních biomarkerů.

## 1. Předčasný porod

Předčasný porod (z anglického preterm birth – PB) je jedním z hlavních příčin novorozenecké mortality a morbidity. Představuje závažný socioekonomický problém, a to jak v pohledu nákladů vynaložených na péči o předčasně narozené, tak jejich následné začlenění do společnosti, pokud dojde k nějakému handicapu. Ačkoliv jeho patologie není zcela objasněna, je známa celá řada rizikových faktorů. Jak již bylo zmíněno, preeklampsie a vývojové vady plodu mohou vést k indukovanému předčasnému porodu. Spontánní předčasný porod, někdy také nazýván předčasný porod idiopatický, je charakterizován předčasným nástupem děložních kontrakcí. Předčasný odtok plodové vody se projevuje odtokem plodové vody bez nástupu děložních kontrakcí. Oba tyto typy mohou být spuštěny některými z těchto rizikových faktorů [2–4]:

- genetické predispozice
- rasové a etnické pozadí (vyšší incidence u afroamerické rasy)
- nízký BMI (méně než 19, více než 30 může být pro plod naopak protektivní)
- nízký socioekonomický status a vzdělání
- extrémní věk matky (pod 20 a nad 35 let)
- kouření, drogová závislost
- dlouhodobý fyzický či psychický stres
- některé vaginální infekce a mikrobiální kolonizace porodních cest (nejčastěji *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus agalactiae*, *Trichomonas vaginalis* a *Chlamydia trachomatis*)
- vliv extragenitální infekce (zejména pyelonefritida, asymptomatická bakteriurie, pneumonie a apendicitida)
- předčasný porod či předčasný odtok plodové vody v minulé graviditě (až dvojnásobné riziko opakovaného předčasného porodu)
- děložní anatomické anomálie
- vícečetná gravidita
- krvácení během probíhajícího těhotenství
- početí pomocí některých metod asistované reprodukce
- předchozí operace na děloze včetně děložního čípku
- potrat po 16. týdnu v předchozích těhotenstvích a další zatím neobjasněné faktory

## 1.1. Patofyziologie

V současné době není zatím zcela jednoznačně vysvětlen princip fyziologického porodu, je tedy obtížné hodnotit porod předčasný. Jednou z teorií je, že z gynekologického hlediska je termínový porod a předčasný porod, co se probíhajících pochodů týče, shodný [2]. U obou dochází ke změně kontraktility dělohy, zrání děložního hrdla a aktivaci decidui a plodových obalů. Základním rozdílem je odlišná aktivace. Termínový porod je aktivován fyziologickým procesem, komplexním pochodem kooperací mezi matkou a plodem, jehož přesný průběh a způsob zahájení zůstává i v současné době částečně neobjasněn. Předčasný porod je spuštěn procesem patologickým [1]. Základním, dosud objasněným a nejvýznamnější patogenetickým procesem (podle souhrnné studie 1. LF z roku 2006) předčasného porodu je zánět [2, 7]. Ten může vzniknout jako odpověď na některý z těchto faktorů [7]:

- infekce
- uteroplacentární ischemie
- porucha imunologické tolerance plodu
- alergie
- nadměrné rozpětí dělohy
- inkompetence děložního hrdla
- porucha metabolismu gestagenu a CRH (corticotrophin-releasing hormone – kortikotropin uvolňující hormon)

Rizikové faktory jsou však pouze předběžným ukazatelem a 4–5 % těhotných bez známek ztížené těhotenské anamnézy, tedy s běžným populačním rizikem, porodí předčasně [3]. Tato skupina pacientek se nazývá *low-risk* skupina a pouze přispívá k tvrzení, že patofyziologie předčasného porodu zatím zcela objasněna nebyla.

## 1.2. Prenatální diagnostika

Prenatální diagnostika je nejčastěji zaměřená na odhalení vrozených vývojových vad plodu, které k předčasnému porodu mohou vést. Indikacemi k prenatální diagnostice jsou vysoký věk matky, pozitivní výsledky biochemického screeningu (základní vyšetření krve a moče v těhotenství), předchozí těhotenství se špatně se vyvíjejícím plodem, vady odhalené ultrazvukovým vyšetřením, choroby matky (*Diabetes mellitus* či fenylketonurie) a další. Rozdělují



se na dvě skupiny, na vyšetřovací metody neinvazivní, kam spadá především ultrazvukové vyšetření a na metody invazivní, které narušují kontinuitu matčina těla. Mezi invazivní metody řadíme amniocentézu – odběr plodové vody přes stěnu břišní pod kontrolou ultrazvuku, biopsii choria, odběr pupečnickové krve a další. S invazivními metodami je spojené zvýšené riziko pro plod i matku, a to především riziko vzniku infekce a následného možného potratu. Frekvence této komplikace je velice nízká, pohybuje se v rozmezí 0,1 % a diagnostický potenciál amniocentézy toto riziko značně převyšuje [2, 8].

Bohužel tyto metody neslouží k včasnému záchytu rizika předčasného porodu. Jednotlivé rizikové faktory, jako je **předčasný odtok plodové vody** (přesněji předtermínový předčasný odtok plodové vody – pPROM), **hrozící spontánní předčasný porod**, **preeklampsie**, **intraamniální zánět** či další komplikace je možné odhalit až poměrně pozdě, kdy už je většinou možná pouze symptomatická léčba.

**Spontánní předčasný porod se zachovaným vakem blan** je prvním typem spontánního předčasného porodu. Nastává ve 40-50 % případů. V diagnostice se využívá termínu hrozící předčasný porod a sleduje se kontraktilita dělohy vedoucí ke zkracování a dilataci děložního hrdla. Při přítomnosti těchto faktorů je vysoké riziko porodu do 7 dnů [9].

**Předčasný odtok plodové vody**, uveden jako jeden z rizikových faktorů a druhý typ spontánního předčasného porodu, je závažná komplikace vyskytující se u 4,5 – 15 % těhotenství. Čím dřív k odtoku dojde, tím je rizikovější. Přibližně ve 20-30 % dochází po předčasném odtoku plodové vody k předčasnému porodu. Hlavními riziky po odtoku plodové vody je vznik intraamniální infekce u matky s možností přenosu na plod (u matky méně časté komplikace), u plodu dále, intraventrikulární krvácení, nekrotizující enterokolitida (porucha trávicího ústrojí), komprese pupečníku, u oligo – až anhydramnion možné deformity končetin, dysmorfie obličeje, plicní hypoplazie i fetální úmrtí [3]. Diagnostika odtoku plodové vody je komplikovaná možností záměny s jinými projevy, jako je únik moči, vaginální výtok (běžný během změn děložního hrdla ale i patologický) nebo následek předchozího pohlavního styku. Poměrně vysokou selektivitu a specificitu v tomto ohledu poskytují dva komerčně dostupné diagnostické testy. Test Actim PROM detekuje přítomnost **IGFBP** (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1). Koncentrace IGFBP je za normálních podmínek vysoká pouze v plodové vodě, která se při prasknutí plodových obalů dostává do vaginy, kde je možné ji pomocí tohoto testu detekovat. Test je rychlý (do 5 minut),

neinvazivní a vykazuje spolehlivost 83–100 %. Druhým testem je Amnisure, pracuje na stejném principu s rozdílem detekce **PAMG-1** (Placental Alpha Microglobulin-1) [2].

V případě pPROM existují dva přístupy k managementu těhotenství: aktivní – vyvolat porod a konzervativní – setrvat v těhotenství. Celosvětově je za správný přístup považován konzervativní přístup, protože bylo recentními studii dokázáno, že nejvýznamnější roli v neonatální morbiditě hraje gestační stáří [5].

Další možností je testování fetálního fibronektinu (**fFN**). Tento protein se ve fyziologickém těhotenství nevyskytuje v cervikovaginálním sekretu mezi 22. a 35. týdnem. Jeho přítomnost tedy koreluje s rizikem PB. Tento test je ovšem zatížen poměrně vysokou chybou. Je potřebná správná preanalytická fáze a mezi faktory ovlivňující výsledky patří předchozí vaginální vyšetření či pohlavní styk, přítomnost krve nebo použití ultrazvukového gelu [4].

**Preeklampsie** je komplexní patologický proces charakterizovaný hypertenzí a proteinurií po 20. gestačním týdnu. Incidence se pohybuje mezi 3–7 %, čímž udržuje prvenství v příčinách předčasného porodu. I přes usilovný výzkum je jeho patologie zatím neobjasněna a předčasný porod je ve většině případů nevyhnutelný s ohledem na zvýšené riziko multiorgánového poškození plodu i matky. Diagnosticky lze prozatím pouze stanovit klinické projevy preeklampsie, mezi které patří hyperurikémie, zvýšené hladiny sérového kreatininu, hypoalbuminémie a zvýšení aminotransferáz [10].

Infekce v etiologii předčasného porodu představuje velmi rozsáhlou a komplexní oblast a pohled na ní se stále vyvíjí. V současné době se používá pojem **intraamniální zánět**, který představuje jak histologické, tak klinické projevy spojené s chorioamnitidou (zánět plodových obalů), funisitidou (zánět pupečníku), decduitidou (zánět sliznice děložní) a **FIRS** (Fetal Inflammatory Response Syndrome – systémové zánětlivé postižení plodu). Intraamniální zánět se může projevovat i bez imunitní odpovědi matky, což jeho diagnózu ztěžuje. Mikroorganismy způsobující intraamniální infekci mohou však plodovou vodu kolonizovat i bez zánětlivé odpovědi. Klinicky se intraamniální zánět projeví většinou až v pokročilém stádiu těhotenství. Proto je nutné vyhledávat metody jeho včasného zachytu. Biochemicky se projevuje zvýšenými hladinami interleukinu 6 (IL-6) v pupečnickové krvi a uvedenými záněty chorionu, decidui a pupečníku. Možnosti prenatální diagnostiky intraamniální infekce jsou velice omezené,

senzitivita vyšetření stanovující diferenciální počet neutrofilních granulocytů a CRP (C – Reaktivní Protein) v séru matky je velice nízká a bez klinických projevů matky nepoužitelná. Přesné stanovení rizika hrozící infekce a FIRS je velice důležité především u pPROM, kde je pro pokračování v těhotenství vyloučení přítomnosti intraamniální infekce klíčové. Pokud chceme zjistit riziko infekce, je odběr plodové vody nevyhnutelný. Pro potvrzení či vyloučení infekce se v současné době používá kultivace, PCR metody či stanovení bakteriální DNA s následnou sekvenací [5]. U běžné kultivace, která je poměrně časově náročná, není jasný rozdíl mezi prostou asymptomatickou mikrobiální kolonizací porodních cest a zánětlivou kolonizací, a navíc špatně odhalí těžko kultivovatelné či nekultivovatelné bakterie. Lze ji však doplnit ultrazvukovým vyšetřením děložního čípku vaginální sondou, která pomůže rozlišit infekci plodových obalů, vody a placenty od prosté kolonizace zánětlivými změnami na děložním hrdle [7]. Metody PCR jsou efektivnější, zato ovšem finančně náročnější. Další možností (využívanou například na gynekologicko-porodnickém pracovišti Fakultní nemocnice Hradec Králové) je test stanovující hladinu IL-6 (Milenia QuickLine IL-6) z plodové vody pacientky [5].

Předčasný porod se v populaci celosvětově vyskytuje řadu let v poměrně neměnném měřítku. Kvalita neonatální péče o předčasně narozené děti se v posledních desetiletích výrazně zlepšila především díky technickým pokrokům i lepšímu porozumění a možnosti optimalizace managementu předčasného porodu. Stres matek, náklady na péči o matku a souvislosti spojené s nezralostí předčasně narozených dětí jsou ale i nadále závažným socioekonomickým problémem [1]. Doposud však nebyl nalezen spolehlivý screeningový nástroj, který by toto riziko včas odhalil a tím pomohl snížit incidenci předčasného porodu v rámci primární prevence. Vhodným nástrojem pro identifikaci biomarkerů předčasného porodu je právě proteomika a s ní spjaté metody.

## 2. Proteomické metody

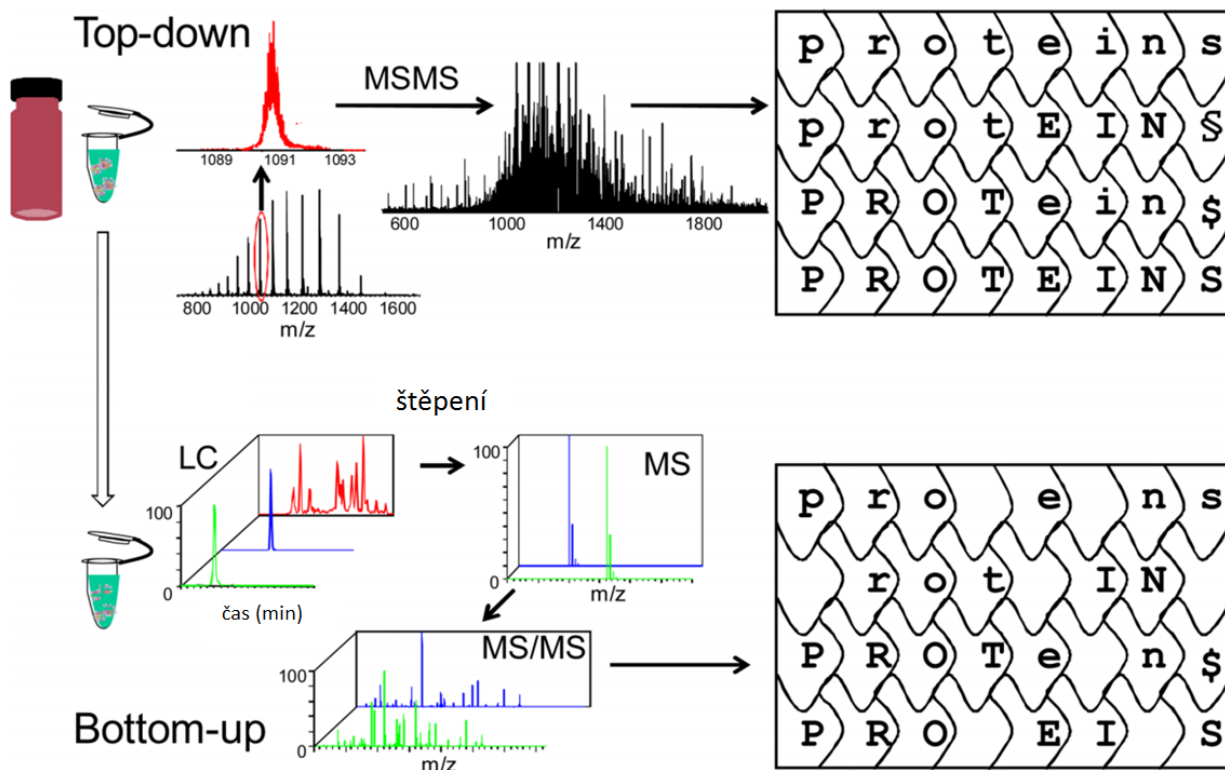
Proteomika je rychle se rozvíjející vědecký obor zabývající se studiem proteinů, jejich vlastností, expresí, lokalizací v buňce a strukturou. Svými poznatky navazuje na genomiku a transkriptomiku. Proteiny jsou efektorové molekuly celého organismu, první reagují na změny fyziologických podmínek, proto prokazují obrovský potenciál při studiu fyziologických i patologických molekulárních mechanismů či při kvalitativním i kvantitativním popisu závažných onemocnění. Základními nástroji proteomiky jsou separační technologie na principu elektroforézy a chromatografie, na straně detekční pak především metody hmotnostní spektrometrie.

V květnu 2003 byl dokončen projekt sekvenování lidského genomu (The Human Genome Project). Tento projekt odhalil, že lidské tělo obsahuje přibližně 25–30 tisíc genů. Každý gen může vést ke vzniku několika typů mRNA a následně k syntéze mnoha rozdílných proteinů, které posléze ještě mohou podléhat post-translačním modifikacím (PTM). V současné době je známo asi 200 druhů různých PTM. Lidský proteom je tedy mnohem obsáhlejší než lidský genom [6]. Ačkoliv dokončení sekvenování lidského genomu znamenalo velký pokrok, pouhá znalost mnoha sekvencí nukleových bází k pochopení fyziologických procesů nestačí, je nutné posouvat hranice znalostí stále dál. Velkým cílem je zmapování celého proteomu zkoumaného organismu. Na těchto projektech pracují vědecké týmy po celém světě. Velký pokrok v tomto oboru učinili v roce 2014 dva na sobě nezávislé týmy, které zveřejnily výsledky mapování lidského proteomu. Rozluštění mapy proteomu v lidském těle přišlo 14 let poté, co byl přečten lidský genom. Vědci z Johns Hopkinsovy univerzity v týmu Akhilesh Pandeye identifikovali a přiřadili proteiny k 17 294 genům, tedy kolem 84 % celkového genomu analýzou 30 různých lidských tkání [11]. Tým z Technické Univerzity v Mnichově Bernharda Küstera díky analýze 60 druhů lidských tkání, 13 druhů tělních tekutin a 147 typů rakovinových buněk v kombinaci s již dostupnými raw daty identifikoval proteiny k 92 % lidského genomu. Tyto výsledky, generované za využití hmotnostní spektrometrie, mohou pomoci odhalit a přispět tak k pochopení i mnoha patologických mechanismů [12]. Dalšími významnými příspěvky v této oblasti jsou například projekty C-HPP (Chromosome-based Human Proteome Project), B/D-HPP (Biology/Disease Human Proteome Project) či švédský Human Protein Atlas další.

Díky možnosti přímého pohledu na produkty fenotypu, nabízí proteomika bezprostřední odpovědi na otázky molekulární fyziologie, ale i specifické přístupy vhodné pro lékařské vědy jako je například identifikace potenciálních markerů onemocnění využitelných pro predikci, prevenci, diagnózu, prognózu a optimalizaci terapie lidských onemocnění. V současné době našla proteomika prozatím spíše experimentální uplatnění v mnoha lékařských oborech či oblastech vývoje léčiv a farmako-proteomiky [13, 14]. Některé proteomické metody mají však potenciál zavedení do běžné diagnostické praxe, jak dokazuje například rutinní využití MS profilování pomocí MALDI-TOF v oblasti klinické mikrobiologie, přes analýzu bezpečnosti potravin a krmiv až po průmyslovou kontrolu kvality díky technologii MALDI Biotyper vyvinuté firmou Bruker. Tato proteomická technika umožňuje identifikaci mikroorganismů porovnáváním naměřených spekter vysoce zastoupených proteinů (na principu otisku prstů) s velice podrobnými knihovny. Analýza je velice rychlá, je možné ji provádět přímo nanesením vzorku bez jakýchkoliv úprav na MALDI destičku [15, 16].

Obecný přístup proteomických metod spočívá převážně v purifikaci či zakoncentrování proteinu nebo separaci proteinové směsi pomocí chromatografických či elektroforetických technik a následná detekce a identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie. Podle požadovaných cílů a účelů se dá proteomika dělit na mnoho podoborů (např. strukturní proteomika, srovnávací, funkční atd.) Z hlediska metodologie se rozlišují dva přístupy: *bottom-up* a *top-down* proteomika [17].

**Top-down proteomika** (Obrázek 1) je metodický přístup, kdy jsou proteiny ze vzorku separovány, hledaný protein izolován a nejlépe jako celá molekula identifikována pomocí hmotnostní spektrometrie. Tento typ identifikace je vhodný pro rychlé určení molekulové hmotnosti a přítomnosti a typu posttranslačních modifikací. Poskytuje tedy základní informace o intaktním (neštěpeném) proteinu [18]. Tento přístup našel uplatnění v rutinní analýze (MALDI Biotyper) pomocí přímého MS profilování v mikrobiologických laboratořích. Ve výzkumu se pak podílí na analýze posttranslačních modifikací a jejich interakcí, v analýze a charakterizaci protilátek. Identifikace nativních peptidů zase umožňuje pohled na protein v téměř fyziologických podmínkách. Další uplatnění našla top-down proteomika v mapování distribuce proteinů přímo ve zvolené tkáni [19].



Obrázek 1: Porovnání top-down a bottom up přístupů v proteomice [20]

**Bottom-up proteomika** představuje klasický postup pro identifikaci proteinů, které jsou nejprve, jak ukazuje obrázek (Obrázek 1), separovány pomocí gelové elektroforézy či chromatograficky, vybrané proteiny či směs je poté enzymaticky štěpena [18]. Nejčastěji se používá proteolytický enzym **trypsin**. Tato serinová proteáza štěpí proteiny vždy za lysinem a argininem (pokud za nimi nenásleduje prolin) a to na C-konci proteinu. Díky zastoupení argininu a lysinu v proteomu tak vznikají peptidy o ideální délce pro MS, tj. 6-20 aminokyselin. Peptidy kratší než 6 aminokyselin nemusí poskytovat unikátní sekvenci, na jejímž podkladě by se dal daný protein jednoznačně identifikovat, na druhou stranu získat sekvenční informaci z peptidů delších než 20 aminokyselin je také obtížné a může být zatížené chybou [21]. Další výhodou použití trypsinu je vznik minimálně dvou pozitivních nábojů na N- a C-konci peptidů (u krátkých peptidů mohou vznikat pouze jedny nabitý fragmenty), dobrá specifita štěpení, jak v gelu, tak v roztoku, a jeho snadná výroba [22].

Ačkoliv jsou MS přístroje schopné poměrně přesně měřit hmotnost intaktních proteinů, je štěpení na peptidy stále ve většině případů praktičtější. I přes vysokou přesnost správného určení hmoty, přesné určení poměru hmotnosti ku náboji  $m/z$ , a senzitivitu MS přístrojů může docházet

stále k chybám. Čím větší je hmotnost proteinu, tím je celková chyba měření větší. Analýza směsi peptidů vykazuje v této oblasti lepší vlastnosti z hlediska jak separace, tak vlastní MS analýzy. Peptidy mají velice podobné chemické vlastnosti, tudíž k jejich separaci není potřeba tak složitých metod jako k separaci směsi proteinů. Další nevýhodou je možnost ulpívání části vzorku při manipulaci na stěnách zkumavky, špičky či kolony, která je výrazně vyšší u analýzy intaktních proteinů než u peptidů. Dále se také analýzou peptidů minimalizují problému spojené s frakcionací, ionizací a fragmentací celých proteinů [23]. U velkých či vysoce hydrofobních proteinů je velmi obtížné přesnou hmotnost změřit, což je způsobené nízkou rozpustností hydrofobních proteinů (nejčastěji membránových), s tím spojenou obtížnou extrakcí a celkovou nekompatibilitou s ionizačními technikami těchto proteinů [24]. Jak již bylo zmíněno, v proteomice se nejčastěji používá k enzymatickému štěpení trypsin. Je možné však využít dalších enzymů, jako je **chymotrypsin**, **Glu C**, **Lys C** či **Asp N**, jejichž specifita štěpení je všeobecně nižší a pro porovnání výsledků s databázemi není vždy vhodná. Enzymy je možné i kombinovat pro dosažení požadovaného výsledku. V praxi mají tyto enzymy své uplatnění ve specifických experimentech. Endoproteináza Glu C je svoji markantně odlišnou specificitou štěpení odlišnou od trypsinu vhodná např. pro štěpení proteinu s oblastmi velkého výskytu lysinu a argininu, protože sama štěpí glutamátová rezidua na C-konci proteinu. Mimo enzymatické štěpení je možné využít štěpení chemického například pomocí kyanobromidu **CNBr**, ten štěpí za methioninem s jeho následnou modifikací na C-konci. Zastoupení methioninových reziduí v proteomu je malé, tudíž i přes vysokou specificitu není toto štěpení časté, kvůli vzniku velkých peptidů nevhodných pro MS analýzu. Další nevýhodou je vysoká toxicita CNBr [21].

*Shotgun proteomika* je speciální odvětví *bottom-up* proteomiky. V *shotgun* proteomice je vzorek nejčastěji nejprve naštěpen a směs peptidů dále separována vhodnou vysokorozlišovací metodou (nejčastěji nanoHPLC) a pak sekvenována pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Z výsledného fragmentačního spektra je složen obraz peptidů, z nichž je pak na základě analýzy zpětně skládán obraz původního proteinů ve vzorku. Tato metoda zaujímá mezi proteomickými metodami vůdčí pozici, protože je schopná nejen podrobně identifikovat velké množství proteinů obsažených v analyzovaném vzorku, ale také popsat kvantitativní změny v koncentracích při rozličných podmínkách. Tato metoda s sebou přináší díky obrovské komplexitě vzniklé peptidové směsi nutnost využít multidimenzionální separační postupy a metod pro identifikaci kombinované s bioinformatikou [18]. Jako každá metoda, má *shotgun* přístup i své nevýhody: je poměrně

náročná na instrumentaci a bioinformatiku při analýze spekter, může zde docházet k interferenci při identifikaci proteinů, které obsahují stejné peptidy a kvůli nutnosti štěpení proteinů na arteficiální směs peptidů ztrácíme informace o jeho primární formě [23].

## 2.1. Separační techniky

Separace směsi peptidů vzniklých enzymatickým štěpením či směsi proteinů je klíčovým krokem v proteomické analýze. Separace vzorku probíhá na principu elektroforézy nebo kapalinové chromatografie a následná identifikace nejčastěji pomocí citlivé detekční metody jakou je hmotnostní spektrometrie. Často je potřeba rozpoznat i změnu jedné aminokyseliny v peptidové či proteinové sekvenci, která může změnit strukturu a tím i výslednou funkci daného proteinu. Proteomickými přístupy je možné analyzovat i vysoce komplexní vzorky, jako jsou tělní tekutiny, tkáně či buněčné lyzáty a další. Některé proteiny jsou citlivé na vnější podmínky a během separace by mohlo dojít k modifikacím. Se všemi těmito komplikacemi musí separační techniky počítat [25].

**Gelová elektroforéza** je starší technika, která má ovšem stále své oprávněné místo mezi současnými separačními technikami. Jednorozměrná gelová elektroforéza (1 DE) separuje látky dle jejich molekulových hmotností v polyakrylamidovém gelu podle jejich pohyblivosti při vložení napětí. Dalším typem elektroforézy je dvourozměrná gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2 DE). Zde jsou látky v první dimenzi separovány dle jejich izoelektrického bodu v gelu s gradientem pH. Izoelektrický bod většiny proteinů leží mezi pH 4 až 8. V druhé dimenzi jsou látky rozděleny dle principu výše uvedené jednorozměrné elektroforézy podle molekulových hmotností. Výsledkem elektroforetické separace je 1D, popř. 2D mapa, kde je po vizualizaci nejčastěji pomocí Coomassie modři či stříbra možno pozorovat skvrny obsahující separované proteiny [26]. Mapy je možné mezi sebou porovnávat, jednotlivé proteiny zafixované na gelu mají své souřadnice dle izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti, intenzita skvrny odpovídá relativní koncentraci [6]. Takto připravené gely, lze dále použít pro MS analýzu. Výhodou elektroforetické separace je zakoncentrování a částečné přečištění vzorků pro další MS analýzu a její malá náročnost na technické vybavení. K limitacím elektroforézy patří nízká senzitivita, kde 2 DE je schopná zviditelnit pouze 30–50 % naneseného vzorku, a to především proteiny vysoce zastoupené, při nanesení většího množství vzorku může docházet ke spojování jednotlivých skvrn, dále pak především reprodukovatelnost jednotlivých gelů [27]. I přes tyto limitace má však své



nezastupitelné využití v analýze proteinových izoform a některých posttranslačních modifikací [26]. Kvůli limitacím spojeným s gelovými metodami došlo k velkému rozmachu metod využívajících kapalinovou chromatografii jako separační techniku.

Pro separaci peptidů se nejčastěji využívá kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP – reverse phase) nebo chromatografie na iontoměničích. Ať už za pomoci výměny kationtů (SCX – Strong Cation Exchange) nebo aniontů (SAX – Strong Anion Exchange). Dalšími možnostmi jsou chromatografické separace s využitím hydrofilních interakcí (HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) anebo elektrostaticky odpuzovaných hydrofilních interakcí (ERLIC – Electrostatic Repulsion – Hydrophilic Interaction Chromatography). Nejsou však běžně využívány [26, 28].

**Chromatografie na reverzních fázích** využívá interakcí mezi nepolární stacionární fází, nejčastěji alkylové řetězce o délce C8 či C18 navázané na silikagelu, a polární mobilní fázi. Trendem v současné době je minimalizace povrchu částic stacionární fáze. S trendem miniaturizace v LC systémech dochází ke zvyšování tlaku a teploty na kolonách. V proteomice používaná vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) se již ve větší míře díky zmenšování diametru plně porézních částic až pod 2 μm přeměnila na ultra vysokotlakou (UHPLC). Další možností je použití takzvaných core-shell částic, částic s pevným jádrem s navázanými funkčními skupinami. Analýzy provedené na kolonách plněných výše zmíněnými částicemi je možno provést za kratší dobu a efektivněji [29]. Pro spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je možné využít off-line spojení pomocí sběrače frakcí či v přímé spojení MS v případě chromatografie, která využívá mobilní fázi přímo kompatibilní s následnou MS detekcí. Příkladem takového spojení je právě výše zmíněná chromatografie na reverzních fázích využívající jako mobilní fázi nejčastěji směs acetonitrilu a vody s přidavkem malého (0,1 %) množství silné organické kyseliny (kyseliny mravenčí či trifluoroctové) [28].

žádné techniky zatím stále neumožňují identifikaci celého proteomu zkoumaného komplexního vzorku. Při vysoké komplexitě vzorku je vhodné využít multidimenzionálního přístupu, tzv. MudPit (Multidimensional Protein Identification Technology). Všeobecně lze komplexitu vzorku redukovat pomocí vícerozměrné separace nebo pomocí frakcionace. Multidimenzionální separace, jak bylo již uvedeno výše, např. 2 DE, nebo vícerozměrné separace na odlišných chromatografických principech, jako je například spojení SCX a RP chromatografie.

Pomocí frakcionace lze vzorek rozdělit na dvě či více frakcí s velmi odlišnými vlastnostmi [30]. Příkladem frakcionací vedoucím ke snížení komplexity vzorku může být rozdělení na frakce obsahující cystein, fosfoproteiny či další a na frakce bez těchto proteinů. Další možností je odstranění vysoce zastoupených proteinů pomocí imunodeplece. Koncentrační rozdíly v zastoupení jednotlivých proteinů v analyzovaném vzorku mohou dosahovat i více jak deseti koncentračních řádů. Více jak 90 % z celkového množství proteinu v lidské plasmě i plodové vodě je tvořeno přibližně deseti nejvíce zastoupenými proteiny, jako jsou albumin, imunoglobuliny a další. Rizikem je, že společně s např. s albuminem odstraníme i nízko zastoupené proteiny, které jej využívají jako transportní protein. I přes toto riziko je imunodeplece často voleným krokem pro analýzu komplexních vzorků [31].

## 2.2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda umožňující získávat informace o přesné molekulové hmotnosti analyzovaného vzorku, ve formě poměru molekulové hmotnosti a náboje  $m/z$ , v případě proteinů i o jejich aminokyselinové sekvenci. V současné době se běžně používá pro identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci proteinů. Metoda jako taková vznikla na poli fyziky a už v 80. letech se stala rutinní metodou pro analýzu malých organických molekul. Pro makromolekuly byla tato metoda kvůli absenci vhodné ionizační techniky nepoužitelná. V 90. letech došlo ovšem k objevu šetrných ionizačních technik, které při ionizaci molekuly nefragmentovaly. Tento objev znamenal obrovský průlom v hmotnostní spektrometrii používané v oblasti biologických věd. Jednalo se o objev elektrospreje (ESI – Electro Spray Ionization) a ionizace za účasti matrice (MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization). Za tento objev byla vědcům Johnu B. Fennovi a Koichi Tanakovi udělena roku 2002 Nobelova cena [28]. Vzhledem k významnosti těchto dvou ionizačních metod pro proteomiku, bude pozornost věnována pouze jim.

Hmotnostní spektrometr se nejčastěji skládá ze tří základních částí: iontového zdroje, kde dochází k ionizaci vzorku, hmotnostního analyzátoru, kde dochází k vlastní separaci podle poměru molekulové hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a detektoru. Jednotlivé typy hmotnostních spektrometrů se liší typem ionizace a analyzátorů, což vede k rozdílné senzitivitě, dynamickému rozsahu, rychlosti analýzy, rozlišení a další [13].

### 2.2.1. Analýza proteinů pomocí MS

Hmotnostní spektrometrie je schopná podat neobyčejně přesné informace o hmotnosti a struktuře analyzovaného vzorku. Všeobecně u hmotnostních spektrometrů hodnotíme tři kritéria: **rozlišení (rozlišovací schopnost)**, **citlivost** a **správnost určení  $m/z$** . Čím je přístroj *citlivější*, tím méně je potřeba vzorku, což je v proteomice a dalších oborech velmi výhodné. V současné době jsou MS přístroje schopny pracovat s množstvím vzorku v oblastí femtomolů ( $10^{-15}$  molů). *Rozlišení* je základním prvkem pro posouzení a charakterizaci MS. Schopnost od sebe odlišit dva ionty s velmi podobnou hodnotou  $m/z$ , se vypočítá podle hodnoty  $m/z$  daného iontu vztažená k šířce daného píku v polovině jeho výšky. Rozlišovací schopnost MS analyzátoru stoupá s klesající hodnotou  $m/z$ , je tedy vhodné uvádět i hodnotu  $m/z$ , ke které je dané rozlišení vztažené [32]. Rozlišovací schopnost nižší než 10 000 je považována za nízkou, 10 000 až 100 000 za vysokou a nad 100 000 za ultravysokou. Pokud využíváme data získaná měřením peptidů k identifikaci proteinů porovnáváním s databázemi, je kladem velký důraz na *správnost určení  $m/z$* , tedy na to, že naměřená hmota se bude co nejvíce blížit hodnotě teoreticky vypočtené. Tato hodnota se uvádí v ppm. Správnost určení  $m/z$  vyšší než 5 ppm je považována za nízkou, přesnost nižší než 1 ppm za extrémně vysokou, vždy ovšem záleží na typu použitého analyzátoru. Pro dosažení vysoké přesnosti určení  $m/z$  je nutná kalibrace přístroje. Nejlepší hodnoty jsou dosaženy pomocí interního kalibrantu, což není vždy z důvodů možné interference při separaci možné, nebo kalibrace na tzv. lock mass při použití externí kalibrace, tedy kalibrace na specifický ion přítomný v každém měření (pocházející ze vzorku, MF či ze vzduchu) [21, 32]. V tabulce (Tabulka 1) jsou uvedené dříve zmíněné charakteristické parametry pro jednotlivé hmotnostní analyzátoři. Mezi jednotlivými parametry je vždy nutné nalézt kompromis pro optimální řešení.

Tabulka 1: Parametry pěti nejčastěji používaných hmotnostních analyzátorů udávaných výrobci [32]

Hmotnostní analyzátor	Rozlišovací schopnost ( $\times 10^3$ )	Přesnost (ppm)	Rozsah $m/z$ ( $\times 10^3$ ) (spodní limit)	Rychlost nahrávání dat (Hz)	Lineární dynamický rozsah	Cena
Q	3-5	Nízká	2-3	2-10	$10^5$ - $10^6$	Nižší
IT	4-20	Nízká	4-6	2-10	$10^4$ - $10^5$	Střední
TOF	10-60	1-5	10-20	10-50	$10^4$ - $10^5$	Střední
Orbitrap	100-240	1-3	4	1-5	$5 \times 10^3$	Vyšší
ICR	750-2500	0,3-1	4-10	0,5-2	$10^4$	Vysoká

## ***Ionizační techniky***

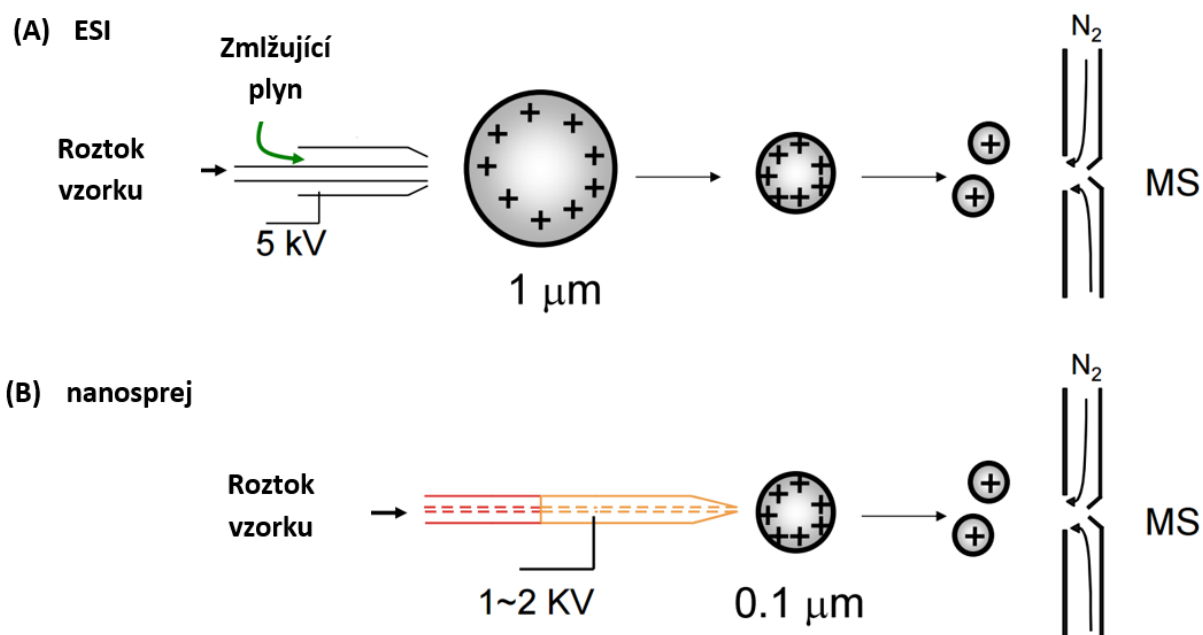
Prvním krokem každé MS analýzy je ionizace. Biomolekuly jako jsou peptidy či celé proteiny lze ionizovat měkkými ionizačními technikami – MALDI a ESI [6, 21].

Při **MALDI ionizaci** je vzorek smíchán s vhodnou matricí, která absorbuje energii laseru, čímž dochází ke kumulaci energie a následné desorpci matrice i se vzorkem. Pro peptidy se nejčastěji používá jako matrice kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxybenzoová, 2,5-dihydroxybenzoová anebo pro ionizaci proteinů kyselina sinapová. Vzorek s matricí je nanesen na kovovou MALDI destičku a je vložen do vakuové části MS. Pokud zaznamenáváme spektra v pozitivním modu, jak je v proteomice nejčastější, má každá molekula peptidu tendenci přijmout jeden proton. Touto technikou tedy vznikají převážně jednonásobně nabitě ionty analytu, které jsou iontovou optikou usměřovány dále do hmotnostního analyzátoru [21, 33]. MALDI bývá nejčastěji spojena s hmotnostním analyzátozem doby letu (**MALDI-TOF MS**), možné je i spojení s jinými typy jako je orbitrap či iontová past (všechny zmíněné analyzátory budou popsány dále).

Na obdobném principu jako MALDI pracuje i technologie **SELDI** (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization). Tato technologie řeší problém komplexity vzorků implementací specifické prefrakcionace. Prefrakcionace probíhá na chromatografických terčících či čípech, které selektivně zachycují pouze požadované proteiny, které jsou pak přímo z terčičku analyzovány obdobně jako z MALDI destičky [34].

Při **ionizaci elektrosprejem – ESI**, vznikají na rozdíl od MALDI ionty přímo z roztoku. Na konec kapiláry je aplikované vysoké napětí (2-6 kV). Díky vloženému napětí a zmlžujícímu plynu, který je veden podél kapiláry, dochází k vytvoření malých nabitých kapiček rozpouštědla s analytem. Postupným odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšování kapiček až na jednotlivé nabitě ionty. Ty jsou pak usměřovány pomocí plynu do MS. V rámci trendu minimalizace v LC-MS analýze často nahrazuje ESI **nanoelektrosprej**, zkráceně **nanosprej**. Na rozdíl od běžného ESI, nanosprej operuje s průtoky v přibližně 50–500 nl/min, vkládané napětí je nižší, obvykle 1-2 kV a také sprejovací špička je speciálně vytvořená. Může být koncovou zúženou součástí kapiláry anebo samostatně s využitím odpovídajícího spojení. Pro ionizaci za takto nízkých průtoků není potřeba zmlžujícího plynu a celková efektivita ionizace je výrazně vyšší (50-60 % vs. 0,1 % u ESI). Další výhodou je možnost delší separace díky menším průtokům, což

umožňuje důkladnou chromatografickou separaci peptidů (či proteinů). Nanosprej má také vyšší toleranci k obsahu solí a k vyššímu podílu vody než u ESI a celkově lepší kompatibilita s nanoLC-MS. Proto je v proteomice velice často nanosprej využíván. Porovnání ESI a nanospreje je na obrázku (Obrázek 2). Tyto typy ionizace dávají vzniknout převážně vícenásobně nabitým iontům [28, 35].



Obrázek 2: Model vzniku iontů při ionizaci: (A) elektrosprej; (B) nanoelektrosprej<sup>2</sup>

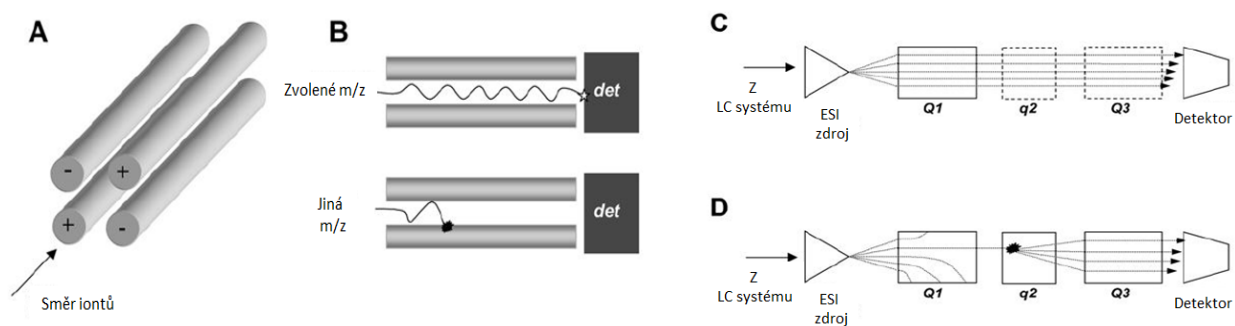
### Typy hmotnostních analyzátorů v proteomice

Hmotnostní spektrum je graf zaznamenávající množství iontů o dané  $m/z$ . Abychom toto spektrum získali, je nutné po odpovídající ionizaci vzniklé ionty patřičně rozdělit. Existuje celá řada hmotnostních analyzátorů pracujících na odlišných fyzikálních principech, každý z nich má svá pozitiva i negativa. Bohužel tak jako neexistuje jednotná ideální ionizační technika pro všechny typy látek, neexistuje ani ideální hmotnostní analyzátor. Kritéria posuzování jednotlivých MS analyzátorů i různá technická spojení již byla zmíněna výše (Tabulka 1). V této části budou

<sup>2</sup> Upraveno podle:  
[http://www.uab.edu/botanicals/pdfs/08\\_Sam090902.pdf](http://www.uab.edu/botanicals/pdfs/08_Sam090902.pdf)

popsány základní principy nejpoužívanějších typů MS analyzátorů, tedy Q, IT, TOF, Orbitrap a ICR a jejich možné kombinace. Speciálním typem analyzátorů jsou analyzátory pohyblivosti iontů, které dělí ionty podle jejich velikosti, náboje, hmotnosti a tvaru [36].

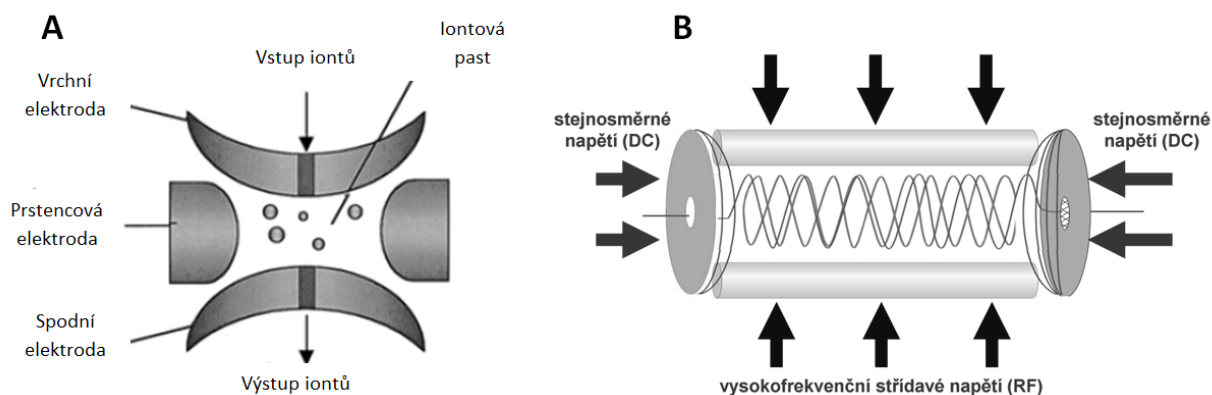
**Kvadrupólový analyzátor (Q – Quadrupole)** se skládá ze 4 kovových paralelně uložených elektrod (Obrázek 3A). Na dvě protilehlé elektrody je vloženo kladné a na zbylé dvě záporné stejnosměrné napětí. Všechny elektrody jsou navíc vystaveny vysokofrekvenčnímu střídavému napětí. Ionty jsou přiváděny z iontového zdroje do středu kvadrupólu, kde začnou oscilovat. V daný časový okamžik, při určitém nastavení poměru amplitudy a napětí, jsou oscilace stabilní pouze pro specifickou hodnotu  $m/z$ . Tento iont může projít, ostatní s nestabilními oscilacemi se zachytí na elektrodách. Postupnou změnou poměru napětí a amplitudy dochází ke skenování všech přítomných iontů (Obrázek 3B). Tento analyzátor je oblíbený pro svou jednoduchost a poměrně nízkou cenu. Jak již bylo zmíněno dříve, často se vyskytuje v konformaci tandemového spojení tří kvadrupólů spojených za sebou (QqQ) nebo jako součást hybridních seskupení spojených s jiným typem hmotnostního analyzátoru (Q-TOF, Q-Orbitrap). Jak je vidět na obrázku (Obrázek 3C a D) tento analyzátor může pracovat v módu skenování (Obrázek 3 C), kde je aktivní pouze první Q anebo při tandemové MS (Obrázek 3D), kde první Q slouží jako hmotnostní filtr, druhý Q plní funkci kolizní cely (proto je také označován malým q) a třetí Q pracuje jako finální hmotnostní analyzátor [21, 36].



Obrázek 3: Schematické znázornění trojitého kvadrupólu QqQ – (A) hmotnostní analyzátor kvadrupól; (B) trajektorie iontů o zvolené a jiné  $m/z$ ; (C) zapojení QqQ při měření ve full skenu (zaznamenávání celého spektra); (D) zapojení při měření v MS/MS módu, kde druhý kvadrupól slouží jako kolizní cely [21].

**Iontová past (IT – ion trap)** patří mezi analyzátory, které pomocí změny na elektrodách zadržují požadované ionty. Dle provedení je dělíme na dva typy, 3D iontovou past a na iontovou

past lineární (Obrázek 4). 3D iontová past je tvořena prstencovou elektrodou a dvěma elektrodami koncovými, na které je vloženo napětí. Ionty jsou napěťovým pulzem přivedeny do pasti a vhodným poměrem a změnami napětí jsou zadržovány. Pouze ionty o požadované  $m/z$  jsou vypuzovány na detektor. Tento analyzátor je možné použít i pro MS vyšších řádů (teoreticky  $MS^n$ ) a to díky možnosti izolace, fragmentace a měření produktových iontů v jednom místě. Pro zlepšení rozlišovací schopnosti je do pasti zaváděn tlumící plyn (He) a je taktéž nutné optimalizovat množství iontů dávkovaných do pasti. Při přetížení dochází ke vzniku prostorového náboje, který má za důsledek razantní pokles rozlišení. Lineární iontová past je v podstatě kvadrupól, na jehož koncích jsou umístěny elektrody s vloženým potenciálem, která záchyt iontů umožňuje. Oproti 3D IT má větší iontovou kapacitu a vyšší účinnost při plnění, záchytu iontů v pasti (u 3D se pohybuje účinnost záchytu kolem 5 %) a detekci iontů. Tento analyzátor je možné dle potřeby přepínat a používat buď jako LIT nebo Q. Celkově je iontová past velice rychlý analyzátor ovšem s poměrně malým rozlišením [36].



Obrázek 4: Analyzátor typu iontové pasti: (A) 3D iontová past<sup>3</sup>; (B) lineární iontová past<sup>4</sup>

**Analyzátor doby letu** (TOF – Time Of Flight) měří dobu, za kterou iont proletí letovou trubicí a dopadne na detektor, kde je tento čas zaznamenán. Rychlost, kterou iont letí je úměrná jeho měrné hmotnosti  $m/z$ . Čím je  $m/z$  menší, tím rychleji iont letí. Analyzátor TOF pracuje ve dvou módech, v lineárním a v módu s reflektorem (neboli iontovým zrcadlem). *Lineární TOF* je

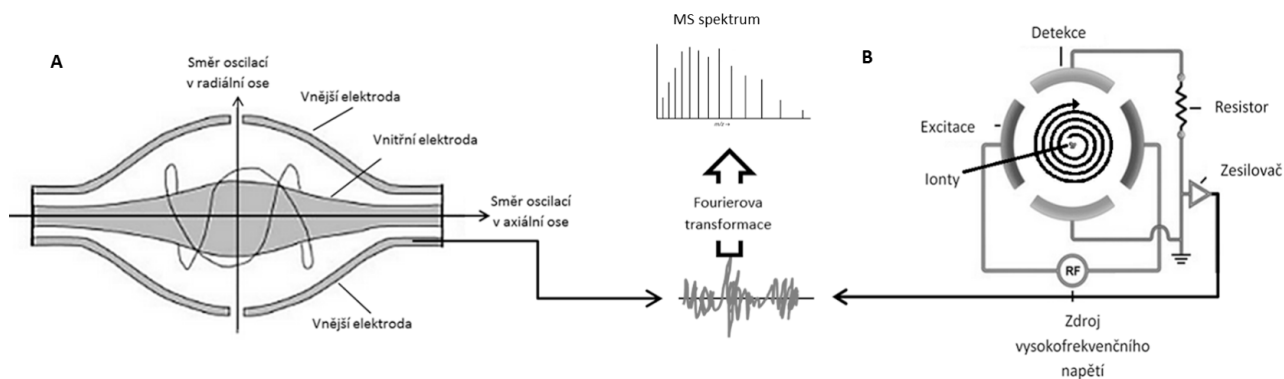
<sup>3</sup> upraveno podle [21]

<sup>4</sup> staženo z [http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek\\_EMSV\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf)

jednoduchý start-cíl analyzátor, kde na počátku je iontům udělena stejná počáteční energie a je měřen čas, za jak dlouho dosáhnou detektoru. Nevýhodou tohoto typu je poměrně nízká rozlišovací schopnost iontů o podobné hmotnosti. Tento problém vyřešil právě již výše zmíněný *reflektron*. Ten tvoří soustava kruhových elektrod, do kterých se ionty při průletu a obratu zanořují a tím sjednocuje energii iontů o stejné  $m/z$ . Hlavní předností je však prodloužení dráhy letu iontů, což zlepšuje rozlišovací schopnost přístroje. Další možností při využití lineárního módu pro TOF je *zpožděná extrakce iontů*. Ionizované molekuly MALDI ionizací mají určitou distribuci kinetické energie a dopadají na detektor v různých časech, což způsobuje rozšíření píků a jejich horší rozlišení, pokud použijeme metodu zpožděné extrakce iontů, ionty budou extrahovány 10–100 ns po aplikaci laserového pulzu, čímž dojde k částečnému vyrovnání jejich kinetických energií a tím zvýšení celkového rozlišení přístroje. Mezi největší výhody spojení MALDI-TOF patří jednoduchost, robustnost a uživatelská přívětivost. Další výhodou MALDI-TOF je vysoká přesnost a rozlišovací schopnost díky inovačním technologiím užívaným v současné době a také velká citlivost, kdy je možné detekovat látky o koncentracích v řádech attomolů ( $10^{-18}$  molů). Dříve byla tato metoda používána pro plně automatizované spojení separace vzorků pomocí 2 DE pro *high-throughput* proteomickou analýzu [21]. V současné době se využívá především k rychlému určení molekulové hmotnosti vzorku a pro rychlou kontrolu v průběhu analýzy, není však rutinní metodou v proteomice. V klinické praxi je toto spojení využíváno, jak bylo již výše zmíněno v technice MALDI Biotyper pro identifikaci mikroorganismů.

**Orbitrap** je nejnovější typ analyzátoru, který v sobě kombinuje separační i detekční část. Skládá se z vnější a středové vřetenové elektrody, na které je přivedeno napětí. Ionty vykonávají pohyb ve směru podél a kolem středové osy analyzátoru (Obrázek 5A). Frekvence podél středové osy je nepřímo úměrná odmocnině z  $m/z$ . Po vstupu do elektrického pole jsou ionty stlačovány pomocí zvyšujícího se napětí. Po stabilizaci napětí se stabilizuje i trajektorie iontu oscilujících kolem středové elektrody. Pomocí matematické úpravy (Fourierova transformace) signálu indukovaného proudu na vnějších elektrodách je získáno hmotnostní spektrum. Stejně jako u IT je zde nutná optimalizace pro vhodné naplnění orbitrapu (někdy také nazývaném elektrostatická iontová past), aby nedocházelo ke vzniku prostorového náboje a tím ke snížení rozlišení [37].





Obrázek 5: (A) Orbitrap a (B) analyzátor iontové cyklotronové resonance s Fourierovou transformací<sup>5</sup>: schéma pořízení hmotnostního spektra analyzovaného pomocí dvou typů hmotnostních analyzátorů [37].

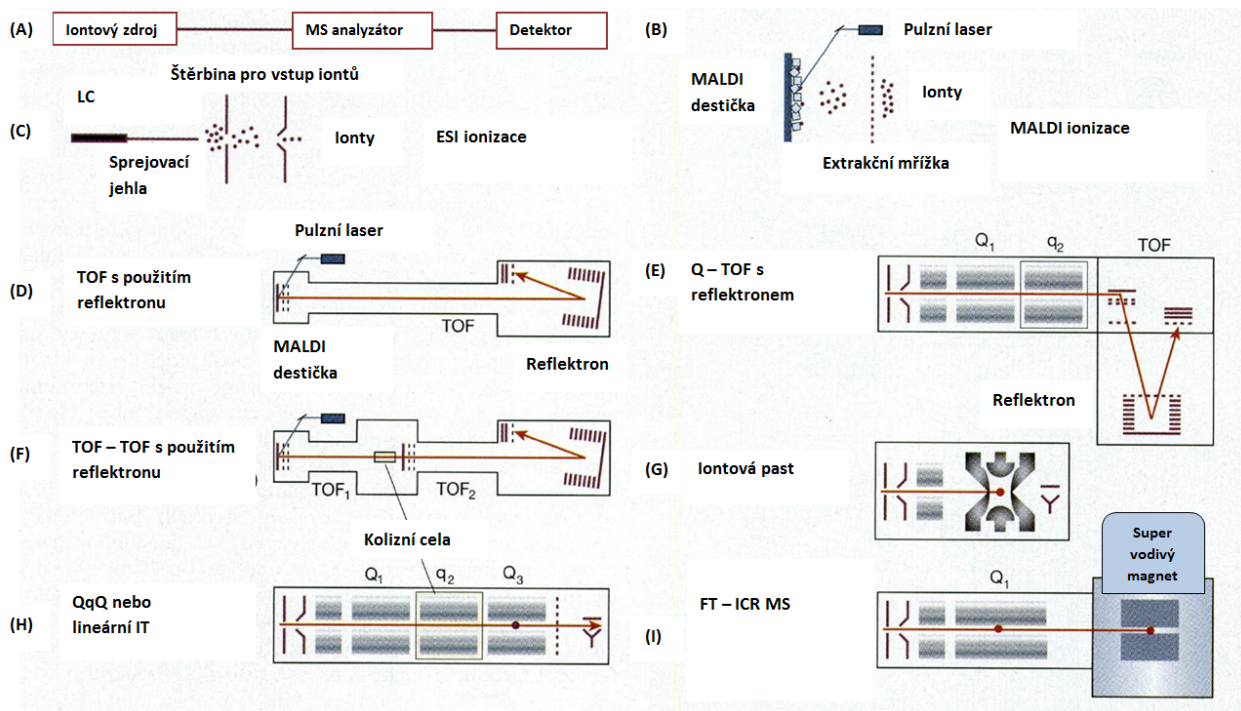
**Iontová cyklotronová rezonance (ICR – ion cyclotron resonance)** využívá celu umístěnou uprostřed velmi silného magnetického pole (Obrázek 5 B). Jakmile se iont dostane do silného magnetického pole, začne se pohybovat po cykloidální trajektorii s frekvencí, která je charakteristická pro každou  $m/z$  hodnotu. Ionty jsou pomocí vysokofrekvenčního napětí excitovány do vyšších oběhových drah, po kterých se pohybují i po vypnutí tohoto napětí. Detekce je stejně jako u orbitrapu založena na měření indukovaného proudu ionty na detekčních deskách. Fourierovou transformací se přepočtou tyto hodnoty do stupnice  $m/z$ , čímž získáme hmotnostní spektrum dané látky. Tento typ analyzátoru vybočuje z charakteristik všech ostatních analyzátorů, a to jak svou rozlišovací schopností, tak i svou cenou a nároky na provoz [21].

### ***Tandemová hmotnostní spektrometrie***

Všechny uvedené hmotnostní analyzátoary lze zapojit do tandemové série a získat tím podrobnější hmotnostní spektrum. Velkou výhodou tandemové MS je, že je schopna podávat přesné informace jak o celkové hmotnosti vzorku, tak o jeho struktuře. V proteomice se často vyskytují tandemová spojení s ESI v podobě trojitého kvadrupólu (ESI-QqQ), kvadrupólu a iontové pasti anebo spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu (Q-TOF). Příklady možného spojení jsou znázorněny na obrázku (Obrázek 6) [21].

<sup>5</sup> Upraveno podle:

<https://nationalmaglab.org/education/magnet-academy/learn-the-basics/stories/what-s-in-an-oil-drop>



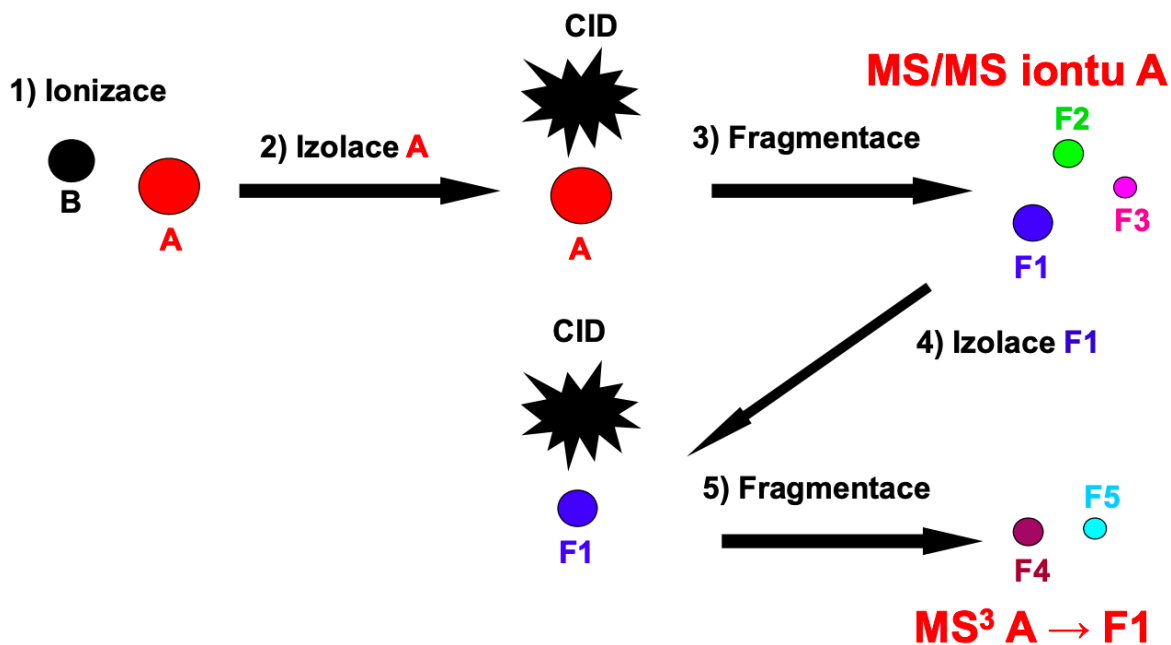
Obrázek 6: Schématické znázornění některých typů zapojení hmotnostních analyzátorů využívané v proteomice – (A) schématické znázornění hmotnostního spektrometru; (B) MALDI ionizace; (C) ionizace elektrosprejem; (D) analyzátor doby letu s reflektorem; (E) spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu s reflektorem; (F) tandemový analyzátor doby letu s reflektorem; (G) Iontová past; (H) tandemové zapojení trojitého kvadrupólu nebo lineární iontové pasti; (I) Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací [38]

Pro přímé spojení LC-MS jsou komerčně dostupné např. tyto hmotnostní analyzátoary: Q, IT, LIT (linear IT – lineární iontová past), QqQ, Q-LIT, TOF, IT-TOF, Q-TOF, Q-IMS-TOF (IMS – ion mobility separation – separace pomocí iontových mobilit), Orbitrap, Q-Orbitrap, LIT-Orbitrap, Q-ICR, LIT-ICR. Pro spojení s MALDI ionizací jsou dostupná tato spojení LIT, TOF, IT-TOF, Q-IMS-TOF, TOF/TOF, LIT-Orbitrap, Q-ICR [32]. V současné době jsou již možná další spojení díky konkurenci výrobců, technickému pokroku a rozšířeným možnostem využití. Pokud se podíváme na aktuální internetové stránky jednotlivých výrobců (*Thermo Scientific, Agilent, AB SCIEX, Waters, Bruker Daltonics, PerkinElmer, Shimadzu, Gilson, Hitachi, Jeol, a Leco* [32]) hmotnostních spektrometrů určených pro LC-MS a MALDI-MS nalezneme další novinky jako například nové hmotnostní spektrometry od firmy *Thermo Scientific*<sup>6</sup> využívající kombinace s vylepšenými parametry (lineární rozsah, přesnost určení hmoty, rychlost nahrávání a možnosti získávání dat atd.) u QqQ (TSQ Quantum Access MAX, TSQ Quantum Ultra, TSQ Vantage) IT

<sup>6</sup> staženo z <http://www.thermoscientific.com/en/home.html>

(LCQ Fleet, LTQ XL Linear, Velos Pro) či orbitrapu (Exactive High Performance, Q Exactive High Performance nebo Q Exactive HF) nebo hmotnostní spektrometr typu Orbitrap Fusion, který kombinuje dokonce tři techniky – kvadrupól, dvoukomorovou lineární iontovou past a orbitální iontovou past (Orbitrap). Tento typ má velice vysoké rozlišení (až 450 000), umožňuje všechny typy fragmentací (CID, HCD a volitelné ETD) a současnou akvizici MS a MS<sup>n</sup>.

Ačkoli jednotlivé hmotnostní analyzátoři fungují na odlišném fyzikálním principu, celkový postup při tandemové MS analýze je obdobný pro všechny typy zapojení. První analyzátor je využit jako hmotnostní filtr zvolené  $m/z$ , další jako kolizní cela a poslední pak jako vlastní analyzátor. Princip fragmentace je znázorněn na obrázku (Obrázek 7). Ionty po ionizaci vstupují do prvního hmotnostního analyzátoru, který slouží jako filtr pro výběr a izolaci požadovaného iontu ze směsi. Poté je vybraný iontový prekurzor fragmentován v kolizní cele (druhý analyzátor) a vzniklé fragmenty jsou následně separovány ve třetím hmotnostním analyzátoru. Jak již bylo zmíněno, toto je možné opakovat teoreticky do nekonečna pro získání MS<sup>n</sup>. Tandemová MS umožňuje zvolit peptid, který je následně fragmentován kolizí s inertním plynem. Profil výsledků fragmentace získané tandemovou hmotnostní spektrometrií může poskytovat částečnou či úplnou informaci o přesné a správné hodnotě molekulové hmotnosti analyzované látky, přesné a správné hodnotě hmotnostních fragmentů vznikajících štěpením rodičovského iontu porovnáním výsledků s databázemi. Dále je možné takto zjistit izotopický profil analytů, retenční charakteristiky při využití hmotnostního spektrometru v kombinaci s kapalinovou chromatografií a v neposlední řadě i obsah analytu ve zkoumaném vzorku za využití metod relativní či absolutní kvantifikace.



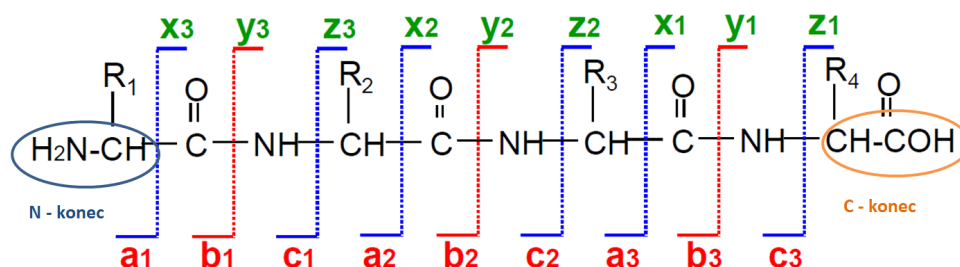
Obrázek 7: Princip fragmentace při tandemové hmotnostní spektrometrii<sup>7</sup>

### Typy fragmentací

Fragmentace může být uskutečněna pomocí kolizní energie (CID – Collision Induce Dissocaition / popř. HCD – High Collision Induce Dissocaition), pomocí záchytu elektronů (ECD – Electron Capture Dissociation), reakcí peptidových kationtů s fluoranthenovým kationtem (ETD – Electron Transfer Dissociation) a další. V proteomice se nejčastěji uplatňuje fragmentace peptidů pomocí CID, popř. HCD či ECD u speciálních aplikací jako je např. fosfoproteomika či kvantifikace. U fragmentace proteinů se nejčastěji využívá ECD či ETD fragmentace. Jednotlivé typy fragmentací se liší podle místa štěpení vazby (Obrázek 8), podle množství použité energie a dle vzniku fragmentačních spekter. Při CID fragmentaci dochází ke srážkám s molekulami neutrálního plynu (např. helium, dusík či argon). Přeměna energie ze srážek na vnitřní energii analyzované látky vede ke štěpení peptidové vazby a dává tak za vznik převážně *b* a *y* iontům. Tato fragmentace je často spojovaná s QqQ nebo FT-ICR analyzátory. Její modifikace HCD je speciální typ fragmentace využívání v hmotnostním analyzátoru orbitrap, kde k vlastní fragmentaci dochází

<sup>7</sup> staženo z [http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol\\_spek/Mol\\_spek\\_prednaska6\\_MS.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf)

v externí cele a je často využívám při kvantifikačních experimentech za použití izobarických značek (viz dále). Fragmentace pomocí záhytu elektronů, jak naznačuje název, fragmentuje pomocí přenosu elektronu z aniontového radikálu. Oproti CID dává ECD primárně vzniknout *c* a *z* iontům s vyššími nábojovými stavy ( $z \geq 2$ ). Vzniklé fragmenty jsou delší, občas až celé proteiny, má tedy velký význam pro *top-down* proteomické přístupy [39, 40].



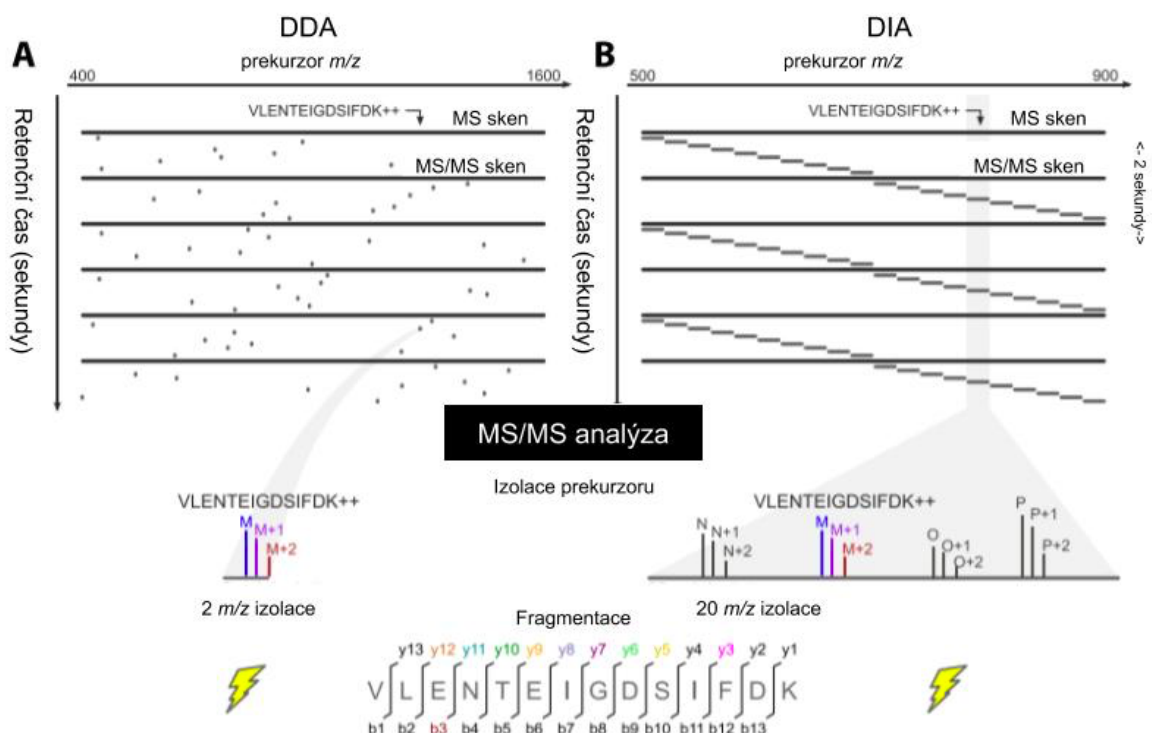
Obrázek 8: Schéma a nomenklatura fragmentace v kolizní cele podle místa štěpení vazby a pozice náboje<sup>8</sup>

### 2.3. Identifikace a kvantifikace proteinů a peptidů pomocí MS

Cílem proteomiky je kompletně nejen identifikovat a kvantifikovat proteom zkoumaného vzorku, ale také se odhalit jeho lokalizaci v buňce, posttranslační modifikace a strukturu. Hmotnostní spektrometrie je velice populární metoda, jak tohoto cíle dosáhnout. Existuje celá řada metod, jak tato data pomocí hmotnostní spektrometrie získat. Hlavní analýza probíhá nejčastěji takzvanými *shotgun* metodami, tedy získání co největšího množství identifikovaných a kvantifikovaných proteinů z mixu peptidů anebo je analýza cílená, která je již zaměřená na izolaci a kvantifikaci specifického proteinu (SRM, viz dále) [41]. Proteomická MS/MS měření nejčastěji zaznamenávají data pomocí **DDA** (Data – Dependent Analysis, analýza závislá na datech, někdy nazýván též IDA – information dependent acquisition), kdy jsou zaznamenány všechny peptidy z daného rozsahu *m/z* a zvolené množství nejintenzivnějších píků je dále izolováno a fragmentováno MS2 skenu (Obrázek 9A). Nevýhodou je, že k fragmentaci dochází akorát u nejintenzivnějších píků z MS skenu, což může vést k částečné absenci fragmentů pro málo zastoupené proteinů ve vzorku. Alternativní možnost skenování dat je **DIA** (Data – Independent Analysis, analýza nezávislá na datech). Tato metoda se snaží řešit problém s absencí spekter nízko zastoupených proteinů. Nefragmentuje totiž pouze vybrané intenzivní ionty, ale všechny ionty,

<sup>8</sup> upraveno podle přednášek prof. Küstra – *Proteomics*, Technická Univerzita Mnichov

kteřé spadají do předem definovaného úzkého m/z okna. Toto okno je pak krokově rozděleno po celé šířce analyzovaného hmotnostního rozsahu a jsou systematicky zaznamenávána všechna MS/MS data a všechny detekované prekurzory (Obrázek 9 B). Tento způsob nahrávání dat využívá např. metoda SWATH (Sequential Window Acquisition Of All Theoretical Mass Spektra – postupné nahrávání dat všech teoretických hmotnostních spekter) [42]. Obrázek 9 zobrazuje rozdíl mezi DDA a DIA metodami [42, 43].

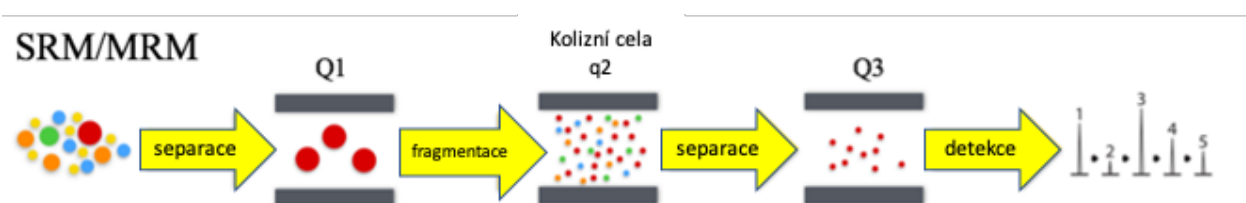


Obrázek 9: Tandemová hmotnostní spektrometrický analýza v DDA a DIA módu [43]

Cílená proteomika je proteomická analýza zaměřená na kvantifikaci předem definovaného proteinu či skupiny proteinů z komplexní směsi. Tento typ analýzy má mnoho podob, nejvyužívanější je **SRM/MRM** (SRM – Selected Reaction Monitoring; MRM – Multiple Reaction Monitoring) přístup. V tomto módu sledování rozpadu iontu je v Q1 vybrán prekurzor, který je v q2 fragmentován za podmínek optimální kolizní energie pro nejintenzivnější produkt a ten je následně Q3 vybrán a dále detekován (Obrázek 10). Dvojice iontů původního prekurzoru a jeho produktu je nazývána hmotnostní přechod (SRM transition) a je velmi vhodným a citlivým kvantifikačním parametrem [44]. Cílená proteomika je další krok navazující na discovery fázi

experimentu pro ověření výsledků např. pro verifikaci potenciálních biomarkerů [42]. Oproti ELISA metodě, která se k ověření výsledků stále velice používá, má SRM/MRM vyšší reprodukovatelnost, flexibilitu a možnost analýzy mnoha proteinů v jedné analýze. Je schopná odhalit i specifické isoformy, a především nevyžaduje specifické protilátky [45].

Identifikace může probíhat na základě peptidů bez použití fragmentačních spekter nebo pomocí fragmentačních spekter. Speciální skupinou jsou identifikace intaktních proteinů [46, 47].



Obrázek 10: Princip cílené proteomické analýzy na příkladu SRM/MRM <sup>9</sup>

Metoda peptidového mapování (**PMF** – Peptide Mass Finger Printing) je identifikační metoda bez použití fragmentačních spekter. Peptidy vzniklé enzymatickým štěpením či celé proteiny jsou analyzovány nejčastěji pomocí spojení MALDI-TOF. Získané hmotnostní spektrum je jakýmsi otiskem prstu, specifickou charakteristikou daného proteinu. Spektra jsou porovnávána s databázemi obsahujícími teoreticky vypočítané hodnoty a je stanovena spolehlivost určení proteinu podle shod s databází. Při PMF hraje velkou roli přesnost určení hmoty (Tabulka 2). Čím je MS přesnější, tím je větší jistota správného přiřazení identifikovaného proteinu. V této době ubývá tato metoda na významnosti právě díky možnostem tandemové hmotnostní spektrometrie [21, 28]. Princip této metody je však uplatnitelný v již dříve zmíněné technologii MALDI Biotyper.

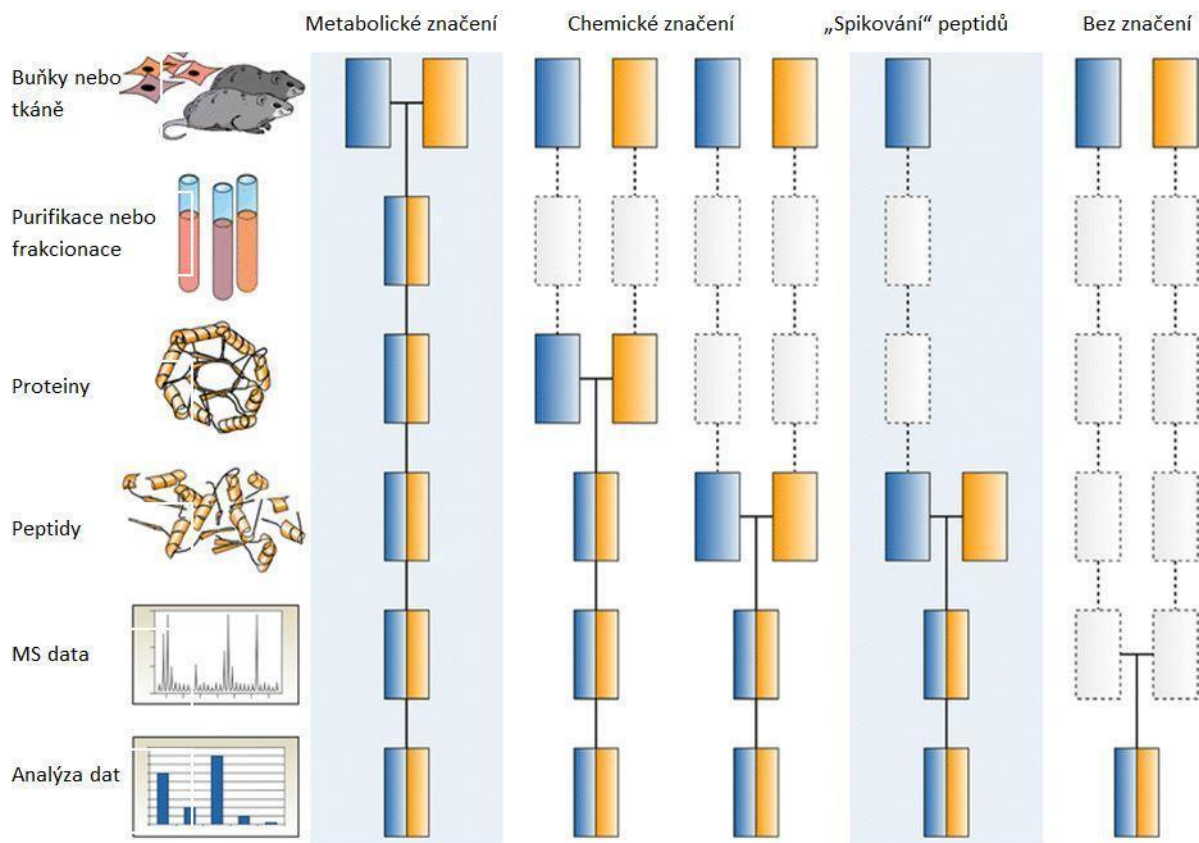
Tabulka 2: Významnost přesnosti určení hmoty u PMF na počet výsledných shod [21]

<i>m/z</i>	Hmotnostní tolerance (Da)	Počet shod
1529	1	478
1529,7	0,1	164
1529,73	0,01	25
1529,734	0,001	4
1529,7348	0,0001	2

<sup>9</sup> staženo z <https://www.creative-proteomics.com/services/parallel-reaction-monitoring-prm.htm>

Identifikace pomocí fragmentačních spekter probíhá pomocí speciálních programů (např. Proteome Discoverer firmy Thermo Fisher Scientific, USA či volně dostupný Maxquant vyvinutý v Max Planck Institutu Biochemie v Německu [48], atd. Nejčastějším způsobem identifikace naměřených dat je porovnávání experimentálních dat s databázemi. K tomuto účelu je možné použít vyhledávače zabudované v programech (např. Mascot nebo Sequest). Je také nutné vybrat vhodnou databázi (např. NCBI, Swissprot) [28]. Proteomické techniky nejsou zatím schopné popsat kompletně celý proteom daného organismu, avšak díky technologickým pokrokům v oblasti vysokorozlišovacích hmotnostních spektrometrů a bioinformatiky, je možné v současné době identifikovat primární proteinovou sekvenci, posttranslační modifikace, proteinové interakce, ale i kvantitativně vyhodnocovat simultánně tisíce proteinů. Kvantifikace proteinů se provádí již řadu let, dříve byly nejčastěji využívány (a stále jsou) metody typu ELISA či Western blotting, které využívají reakcí specifických protilátek. Vývoj specifických protilátek je ovšem časově i finančně náročný a vzhledem k markantnímu rozvoji proteomiky není možné vytvořit protilátky pro všechny zajímavé proteiny včetně jejich modifikací. Naštěstí je v současné době díky pokroku v přístrojovém vybavení hmotnostních spektrometrů a vyhodnocovacích programů nahradit nebo alespoň doplnit nedostatky imunologických metod [49]. Za pomoci těchto přístupů je možné sledovat změny absolutní, ale i relativní změny v koncentracích či expresi sledovaných proteinů v buňkách za určitých podmínek. Sledování těchto změn umožňuje **kvantitativní proteomika**. Možností kvantifikací je několik: metody využívající izotopově značenou kotvu (**ICAT** – Isotope-Coded Affinity Tag), stabilními izotopy značené aminokyseliny (**SILAC** – Stable Isotope Labeled Amino Acid), metody izobarického značení pro relativní a absolutní kvantifikaci (**iTRAQ** – Isobaric Tags For Relative And Absolute Quantification/ **TMT** – Tandem Mass Tags) nebo metody bez použití značení (**Label Free Quantification** – **LFQ**) [50]. Přehled ukazuje obrázek (Obrázek 11).





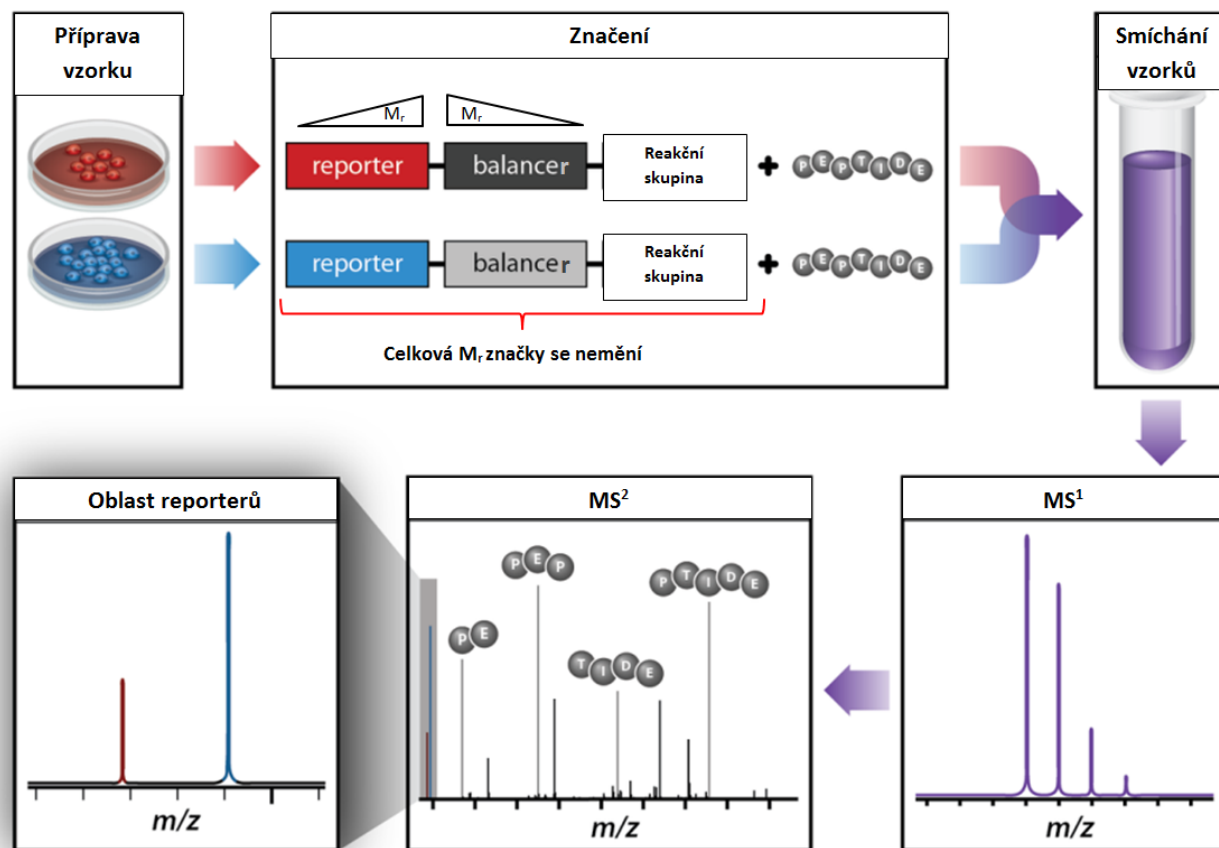
Obrázek 11: Kvantifikační metody pro hmotnostní spektrometrii – Modré a žluté obdélníky značí dvě odlišné experimentální podmínky, horizontální pruhy indikují, kde dojde ke smíchání vzorků, přerušované čáry naznačují místa, kde může být vnesena chyba odlišným zpracováním vzorků [51]

Metoda **SILAC** využívá *in vivo* zakomponování izotopově značených aminokyselin do proteinů během kultivace buněk v médiu obsahujícím lehkou a těžkou formu specifické aminokyseliny, nejčastěji argininu. Jednotlivé experimenty (lehce, těžce značené buňky a kontrola bez značení) nevykazují chemicky žádné odlišnosti, je tedy možné je ihned po kultivaci smíchat dohromady a vzorky zpracovávat jako jeden experiment, čím se výrazně snižuje experimentální chyba při oddělení zpracování vzorků. Nevýhodou je možnost neúplné přeměny na značené aminokyseliny, možnost konverze argininu na prolin a značnou závislost na průběhu endogenního zainkorporování do proteomu vzorku. Velkou nevýhodou je také skutečnost, že tato metoda není určena pro značení primárních vzorků, tedy přímo tkání získaných od pacienta apod., kde není možné připravit kontrolní skupinu za úplně stejných podmínek. Tento nedostatek vyřešila metoda Super-SILAC, která využívá jako interní standard pět karcinogenních buněčných linií značených metodou SILAC [52]. Metodou SILAC je možné vytvořit celý značený organismus, např. myš nebo mouchu podáváním značené stravy. Tento proces je však velmi dlouhý a finančně náročný.

Běžně se SILAC využívá pro globální studium proteomu, ve funkční proteomice nebo ve studiu posttranslačních modifikací proteinů [17, 53].

Metodou **ICAT** je možné ze vzorků izolovat a izotopové naznačit proteiny obsahující cystein. Získaná směs je oproti původnímu vzorku, co se komplexity týče, velice redukovaná a představuje možnost lepší a podrobnější identifikace. Běžně již však není v proteomické praxi využívána [53].

Metody izobarického značení pro absolutní a relativní kvantifikaci ať už **iTRAQ** nebo **TMT** využívají chemického značení na úrovni peptidů či proteinů pomocí amino – reaktivní skupiny vázající se na koncové a volné N-konce lysinu. Souhrnně lze mluvit o metodách využívající izotopového ředění. Princip značení je vidět na obrázku (Obrázek 12). Všechny TMT i iTRAQ značky se skládají ze tří částí; první je část reporterová (reporter region), druhá dorovnávací (balancer) a třetí reakční skupina. Celková hmotnost reporteru i balanceru je shodná u všech variant značení. Po naznačení se tedy rozdíl u jednotlivých typů značek projeví až v MS/MS spektru, kdy dojde k oddělení reporteru. Během chromatografické separace a v MS<sup>1</sup> jsou od sebe jednotlivé variace značek neodlišitelné. V MS/MS experimentu, kdy se fragmentací oddělí reportery je možné relativně kvantifikovat jednotlivé vzorky. Podle použití značek lze libovolně naznačit a simultánně analyzovat až 10 vzorků najednou. Izobaricky značené peptidy je možné analyzovat na mnoha typech hmotnostních analyzátorů. Původně byly tyto experimenty prováděné na analyzátoch typu MALDI-TOF/TOF [54] a Q-TOF [55]. Oba tyto typy jsou schopné detekovat velmi nízké *m/z* oblasti, kde se vyskytují ionty reporterových částí značek. Standardní využití CID fragmentace není možné z principu využít u analyzátorů typu iontové pasty, která není schopná detekovat takto nízké oblasti *m/z*. Tento problém lze, jak ukázal Bantscheff et al. a Griffin et al., překonat optimalizací parametrů měření [56]. U využití HCD fragmentace se izobarické značky dají použít ve spojení QTOF, IT, TOF-TOF či instrumenty typu Orbitrap, které umožňují kombinace typu fragmentací [57]. Byly však publikovány i experimenty využívající ETD [58].



Obrázek 12: Princip značení pomocí izobarických značek<sup>10</sup>

Jednotlivé typy značek se od sebe liší, a to nejen počtem vzorků, které lze multiplexovat, ale také výslednými počty identifikací a množstvím a kvalitou získaných dat. Při použití TMT 10 plex značení je díky charakteru značky, kde je nahrazen jak  $^{14}\text{N}$ , tak  $^{12}\text{C}$  těžším izotopem (tedy  $^{15}\text{N}$   $^{13}\text{C}$ ), je možno identifikovat 10 vzorků najednou. Což vede nejen ke zvýšení počtu současně měřitelných vzorků, ale tím, že jsou vzorky měřeny společně i ke snížení chybějících hodnot pro vyhodnocení. A především zde nedochází ke zhoršení kvality spekter, jako je tomu u použití iTRAQ značek, pokud vyměníme iTRAQ 4-plex za 8-plex, můžeme sice změřit více vzorků, současně ale díky větší molekulové hmotnosti 8-plexu dochází k interferenci značek ve spektru a zhoršení celkové identifikace vzorku. Při porovnání množství identifikací vychází dle studií nejlépe iTRAQ 4plex. Kombinovat lze ovšem pouze 4 vzorky, je tedy potřeba více přístrojového času a jednotlivé sady

<sup>10</sup> Upraveno dle [https://en.wikipedia.org/wiki/Isobaric\\_labeling](https://en.wikipedia.org/wiki/Isobaric_labeling)

vzorku se od sebe mohou více lišit, vzniká více chybějících dat. Jaký typ značky bude použit je tedy vždy třeba důkladně zvážit [57, 59].

Nevýhodou této metody je vysoká cena značek a časově náročná inkorporace při porovnání s LFQ. Je také nutné mít dostatečně citlivou instrumentaci a dbát na přesnou přípravu vzorku [60]. Ačkoliv je efektivita značení běžně velice vysoká, pokud jsou ve vzorku primární aminoskupiny obsaženy na jiných místech či zavedeny během přípravy (třeba v pufrách), mohou se značkami interferovat. Dalšími nevýhodami je možná komprese poměrů značek způsobená kofragmentací během MS<sup>1</sup> analýzy, kdy je izolován společný prekurzor pro více peptidů [61] a následné identifikace a kvantifikace je provedena na základě intenzity pouze malé části celé molekuly [56], což může ve srovnání s LFQ snížit počet získaných identifikací. Tento problém lze částečně řešit dodatečnou fragmentací a měření MS<sup>3</sup> spektra či softwarovými korekcemi [56]. Izobarické značení je vhodné pro velké proteomické studie srovnávající kvantitativní zastoupení nebo změny exprese a následné koncentrace proteinů ve velkém množství vzorků. Velice vhodné jsou pro kvantifikaci potenciálních biomarkerů různých onemocnění či pro široký screening velké populace vzorků [40]. Výhodu má izobarické značení především v možnosti multiplexování vzorků. Použitím značení je možné analyzovat 4–10 vzorků (dle použité značky) v jednom LC-MS/MS měření, což vede ke zkrácení celkové doby analýzy a snižuje se chyba vnesená porovnáváním více měření nutných pro LFQ experimenty [57]. Další výhodou je jednoduché provádění replikátů a snižuje množství chybějících hodnot, což je velice žádoucí u experimentů zaměřených na expresi proteinů v daném stavu (porovnání různých stádií buněčných diferenciací, porovnání účinků léčiv, identifikace interakcí mezi proteiny a léky či měření odpovědi inhibitoru) [59]. U experimentů zaměřených na kvantifikaci pomocí MS<sup>1</sup> totiž nemusí být v každém měření zvolen k fragmentaci totožný iont, což vede k následným chybějícím hodnotám, což vede ke snížení počtu identifikací a kvantifikace. Další nespornou výhodou je univerzálnost použití. In vitro izobarické značení je možné použít na širokou škálu vzorků od buněčných linií, lidských tkání a tekutin po modelové vzorky zvířat [57].

Metoda tzv. **spikování peptidů** využívá  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  nebo  $^{18}\text{O}$  značené syntetické peptidy, použité jako vnitřní standardy, které mohou obsahovat i různé modifikace jako je fosforylace, aby se dala lépe absolutně kvantifikovat sledovaná změna. Kvantifikace za pomoci spikování je dosažena díky možnosti extrakce iontového chromatogramu a porovnání plochy pod píky mezi interním standardem (přidaném ve známém množství) a vzorkem. Alternativně lze kvantifikovat na základě MS/MS spektra pomocí fragmentační píků. Velkou výhodou využití metod pro absolutní kvantifikaci je možnost určení absolutní koncentrace nemodifikovaných proteinů (na rozdíl od kvantifikace na základě chemické modifikace – izobarické značení) a jejich posttranslačních modifikací. Nejčastěji je spikování prováděno před štěpením vzorku, nedochází tedy ke vnášení velké variace způsobené odděleným zpracováním vzorku a poměr mezi interním standardem a vzorkem je zachován. Právě kvůli využívání syntetických peptidů je tato metoda vhodnější pro cílené analýzy zaměřené na kvantifikace specifických proteinů než pro kvantifikace velkého množství proteinů ve vzorcích [53]. Pomocí spikování lze ovšem kvantifikovat i pouze relativně, a to v případě vmíchání stejného množství syntetického peptidu do vzorků a porovnávání změn pouze relativně, což lze i v případě neznačeného interního standardu. V tomto případě se již však jedná o label free kvantifikaci čili o kvantifikaci bez použití značení [62].

Kvantifikace bez použití značení – **label free quantification** – **LFQ** je metoda relativního porovnávání kvantitativních změn mezi dvěma či více vzorky. Na rozdíl od jiných kvantifikačních metod nepoužívá žádné značení a nejčastěji využívá dvě odlišné strategie pro kvantifikaci dat: měření a porovnávání intenzity peptidového prekurzoru získaného z hmotnostního spektra daného proteinu nebo počítání a porovnávání celkového počtu fragmentačních spekter použitých pro identifikaci daného proteinu, což je v současné době již poměrně zastaralá technika. Při porovnávání intenzit peptidových prekurzorů je pro každý peptid ze spektra vytvořený iontový chromatogram a jednotlivé plochy pod píky jsou integrovány podle chromatografického časového rozpětí. Jednotlivé plochy jsou pak mezi sebou porovnávány. U této metody, stejně jako u ostatních metod využívajících  $\text{MS}^1$  kvantifikaci, je důležité vysoké rozlišení hmotnostního analyzátoru, které zabrání interferenci signálů z iontů s blízkým  $m/z$  vybranému peptidu. Při porovnávání počtu spekter použitých pro identifikaci jednotlivých proteinů se vychází z předpokladu, že čím více je daného proteinu ve vzorku, tím více MS/MS spekter pro peptidy z daného proteinu bude získáno. Na základě tohoto předpokladu lze tedy proteiny ve vzorku kvantifikovat. Label free kvantifikace je jednou z nejméně přesných kvantifikačních metod, a to

z důvodů odděleného zpracování a měření vzorků, kde dochází k vnášení chyb do experimentální fáze. Mezi přednosti této metody se řadí především absence časově náročného zakomponování značek do materiálu (jako je tomu u SILAC metod či jiného značení) a s tím spojená i menší finanční zátěž. Množství porovnávaných vzorků oproti jiným metodám, kde je možné porovnávat maximálně deseti vzorků (TMT10plex), je teoreticky neomezené. Celkový dynamický rozsah je u LFQ větší. Přehledná tabulka porovnávající zde uvedené kvantifikační metody je uvedena níže (Tabulka 3). Další a podrobnější informace týkající se kvantifikace proteomických dat lze najít např. v těchto publikacích [25, 50].

*Tabulka 3: Porovnání kvantitativních metod využívaných v proteomice [25]: Porovnání možností aplikování metody, její přesnosti s ohledem na chyby při zpracování a měření vzorku, jejich kvantitativní pokrytí celkového proteomu vzorku a lineární rozsah, pro která je daná metoda použitelná.*

<b>Metoda</b>	<b>Aplikace</b>	<b>Přesnost</b>	<b>Kvantitativní pokrytí proteomu</b>	<b>Lineární dynamický rozsah (řády log stupnice)</b>
<b>SILAC</b>	Komplexní postup Porovnání 2-3 stavů Vhodné pouze pro buňky	+++	++	1-2
<b>Chemické značení proteinů (MS)</b>	Střední až komplexní postup Porovnání 2-3 stavů	+++	++	1-2
<b>Chemické značení peptidů (MS a MS/MS)</b>	Středně komplexní postup Porovnání 2-10 stavů	++	++	2
<b>„Spikování“ peptidů</b>	Středně komplexní postup Cílená analýza na vytipované proteiny	++	+	2
<b>Label free</b>	Jednoduchý postup Analýza celého proteomu Porovnání mnoha stavů	+	+++	2-3

Všechny tyto přístupy, ať už za použití značení či LFQ metody, mají své výhody a nevýhody. Při výběru je nutné zohlednit mnoho faktorů ať už biologických, finančních či přístrojových, stejně tak i možnosti statistického zpracování takto získaných dat, které je při analýze takto komplexních dat zcela zásadní [60].

### 3. Biomarkery předčasného porodu a proteomická MS analýza plodové vody

Jak již bylo zmíněno v úvodu, předčasný porod patří mezi závažné komplikace nejen současného porodnictví, ale i celosvětového zdravotnictví. Nejen že se značnou měrou podílí na neonatální mortalitě, předčasně narozené děti nesou následky po celý život a pre – i postnatální léčba je velmi nákladná. Preventivní strategie ztroskotávají na faktu, že v současné době není známý žádný biomarker, který by byl schopen na riziko předčasného porodu upozornit ve značném předstihu, aby se v tomto případě dal management těhotenství přizpůsobit dané situaci.

Obecně je **biomarker** veličina, která objektivně posuzuje a stanovuje odpověď organismu na daný fyziologický či patologický proces. Pro praxi využitelný biomarker musí splňovat následující kritéria: musí být dostatečně citlivý, musí mít vysokou specifitu ke sledované změně a musí být orgánově specifický. Optimálně by měl dále korelovat svou koncentrací s rozsahem poškození organismu. Z hlediska použití by měl být dále jednoduše interpretovatelný, jeho stanovení jednoduché a finančně nenákladné [34]. Z těchto důvodů je hledání vhodných biomarkerů obtížné a většina potenciálních kandidátů tyto podmínky nesplní. S ohledem na komplexitu předčasného porodu nelze očekávat, že by bylo možné v budoucnu tento stav posuzovat dle jednoho parametru, který by včasně indikovat skupinu pacientek s rizikovým stavem vedoucím k předčasnému porodu, ale mělo by se spíše jednat o komplex snížených a/nebo zvýšených markerů v porovnání s fyziologicky probíhajícím těhotenstvím. K nalezení vhodných markerů tohoto komplexního problému bude potřeba i využití mezioborových přístupů. V současné době proto neprobíhají studie zaměřené na identifikaci prediktivních markerů předčasného porodu nejen na poli proteomiky, ale také metabolomiky [63], studie profilování mikroRNA [64], transkriptomiky, genetiky, genomiky, imunologie a dalších mnoha dalších přidružených oborech [65].

Pro identifikaci biomarkerů předčasného porodu lze využít mateřskou plazmu nebo sérum, plodovou vodu, cervikovaginální tekutinu, placentu či plodové obaly. K analýze plodové vody se nejčastěji používají tři základní proteomické přístupy: 2 DE, proteomické profilování (MALDI a SELDI) a s rozvojem tandemové MS především *shotgun* proteomika [34, 66].

Nejvíce markerů bylo dosud popsáno z analýzy mateřského séra. Významné vztahy mezi markerem a PB byly ovšem popsány pouze u studiích provedených s malým počtem žen a bez

verifikací a validací nemají tyto markery možnost uplatnit se v klinické praxi. Mnoho markerů je také spojeno s dalšími chorobami či patologickými stavy, což snižuje jejich vypovídací hodnotu. Často také studie vykazují protichůdné či nedostatečné výsledky. Dosud bylo popsáno velké množství sérových markerů. Obecně autoři popisují významný vztah mezi markerem a předčasným porodem ve studiích s malým počtem žen. O běžném používání těchto markerů se nedá uvažovat dříve, dokud nebudou k dispozici přesvědčivější studie. Absence vědeckých důkazů o efektivitě primárních faktorů vede u mnohých lékařů ke skepsi. Studie, které hodnotí programy na prevenci předčasných porodů, mají rozporné výsledky. Nedostatek důkazů lze vysvětlit tím, že mnohé studie kombinují spontánní a indukovaný předčasný porod, což neodpovídá stejným preventivním aktivitám. Kromě toho obvyklá prevence je většinou jen málo (pokud vůbec) účinná u žen s vysokým rizikem.

Z hlediska intenzivní standardní prenatální péče a poměru spontánních předčasných porodů je pozorovaný efekt této péče malý. Z etického a praktického hlediska je rovněž obtížné porovnávat dvě skupiny, z nichž jedné není poskytována ani základní prenatální péče. Do doby, než tyto primární faktory budou nahrazeny specifitějšími nebo dokonce více etiologickými faktory, zůstane péče pouze symptomatická a bude mnohým pacientkám poskytována zbytečně. Současná preventivní opatření na regionální nebo národní úrovni jsou neúčinná anebo (příležitostně) nesprávně poskytovaná.

A konečně, je stále ještě obtížné prokázat jejich efekt v zemích, kde je velmi dobře uplatňována preventivní politika. Na základě těchto faktů multicentrická studie EUROPOP vyhodnotila a popsala frekvenci pracovní neschopnosti v 17 zemích a studovala těžkou práci jako primární faktor předčasného porodu. U těžké práce nebyla zjištěna souvislost s předčasným porodem v zemích, kde byla často předepisována pracovní neschopnost v rámci prenatální péče, měla však významnou souvislost v ostatních zemích, a to i po úpravě na další socioekonomické faktory.

Vzhledem k tomu, že neexistují rozhodující důkazy, primární faktory se obvykle nepovažují za významné v boji proti předčasným porodům. Často se zapomíná, že vyhledávání žen s vysokým rizikem v obecné populaci je jedním ze základů současného zdravotnického systému. U takových žen jsou přítomny mnohé psychosociální rizikové faktory pro jiné poruchy, než je předčasný porod, a zvážení těchto primárních faktorů by mělo umožnit zařazení žen do vhodnějších léčebných



režimů. Konkrétní příklady ukazují, že vhodná prenatální péče může být účinná v různých podskupinách určených na základě těchto primárních faktorů.

Z dosavadních studií je známé uplatnění cytokinů, matrixmetalloproteináz a prostaglandinu v patogenezi předčasného porodu [7].

Mezi další potenciální biomarkery lze řadit **interleukin 6** (IL-6). Z vyšetřovaných cytokinů má IL-6 nejvyšší specificitu a senzitivitu. Je možné jej stanovit i metodou ELISA. Nejvyšší hladiny tohoto proteinu byly zjištěny u pacientek s následnou prokázanou chorioamnitidou [67]. Jak bylo uvedeno výše, je v praxi využíván k odhalení infekce.

**Heat shot protein 70** (HSP70) je jeden z nejlépe definované skupiny heat shot proteinů vyskytující se téměř v každé subcelulární struktuře, kde se podílí na udržení optimální terciární struktury a také na specifické i nespecifické imunitní odpovědi. Ve studii zaměřené na pacientky s pPROM se významné rozdíly v koncentracích mezi pPROM a kontrolou neprokázaly [68]. V další studii porovnávající koncentraci HSP70 v plodové vodě pacientek ve druhém trimestru, s termínovým porodem, pacientky se spontánním předčasným porodem bez infekce a s intraamniální infekcí došli k závěru, že zvýšené hladiny tohoto proteinu jsou asociované s intraamniální infekcí, histologickou chorioamnitidou a termínovým porodem. Není však možné mezi nimi jednoznačně rozlišit. Toto zjištění vede k závěru integrace HSP70 do mechanismu porodu [68].

Slibným biomarkerem je taktéž **glykodelin**, glykoprotein patřící do skupiny lipokalinu. V těhotenství hraje klíčovou roli, podílí se na udržení imunitní tolerance matky vůči plodu. Jeho snížené koncentrace byly zatím popsány u potratů [69]. Jeho vztah k předčasnému porodu je zatím předmětem dalšího zkoumání.

Velice zajímavou skupinu ve vztahu k předčasnému porodu tvoří **neutrofil defensiny**, známe svými protizánětlivými účinky. Společně s **calgranuliny A a B** jsou neutrofil defensiny 1 a 2 využívány při stanovení intraamniální infekce a zánětu pomocí tzv. MR skóre. SELDI-TOF MS analýza plodové vody *top down* přístupem přiřazuje na základě přítomností píků pro identifikaci těchto 4 markerů skóre. Hodnoty 0-2, tedy přítomnost maximálně dvou z těchto markerů zánět či infekci vylučuje, naopak hodnoty 3-4 zánětlivý stav indukují [70].

Souhrnná studie zaměřená na systematický přehled literatury dosavadních experimentálně zjištěných biomarkerů předčasného porodu z roku 2011 udává tabulku (Tabulka 4) biomarkerů získaných z pěti studií analýzou rozlišných tělních tekutin a tkání [71].

Tabulka 4: Seznam potenciálních markerů předčasného porodu získaných proteomickými metodami [71]

<b>Doporučené názvosloví proteinů v anglickém jazyce</b>	
14-3-3 protein sigma	L-lactate dehydrogenase A chain
78 kDa glucose-regulated protein	Lysozyme C
Actin, cytoplasmic 1	Membrane-associated progesterone receptor component 2
Actin, cytoplasmic 2	Mimecan
Alpha-1-acid glycoprotein 1	Mucin-5B
Alpha-1-antitrypsin	Neutrophil defensin 1
Alpha-actinin-4	Neutrophil defensin 1
Annexin A3	Neutrophil defensin 3
Annexin A4	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
Annexin A5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
Apolipoprotein A-I	Periplakin
Complement component C9	Plasma kallikrein
Cystatin-A	Plastin-2
Cystatin-B	Profilin-1
Desmoplakin	Protein AMBP
Endoplasmic reticulum resident protein 29	Protein disulfide-isomerase
Endoplasmin	Protein S100-A11
Galectin-1	Protein S100-A12
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Protein S100-A7
Haptoglobin	Protein S100-A8
Heat-shock protein beta-1	Protein S100-A9
Histone H1.2	Retinol binding protein
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	Rho GDP-dissociation inhibitor 2
Histone H4	Ribosomal protein S6 kinase alpha-3
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Serotransferrin
Interleukin-7	Serpin B3
Isoform 4 of Tropomyosin alpha-1 chain	Sex hormone-binding globulin
Isoform C of Fibulin-1	Small proline-rich protein 3
Junction plakoglobin	Thrombospondin-1
Keratin, type I cytoskeletal 19	Thymosin beta-4
Kininogen-1	Transgelin
Lactoylglutathione lyase	Vimentin
Lipocalin-1	Vitamin D-binding protein

Tento seznam získaný analýzou pouze pěti studií poukazuje na značný rozmach primárního výzkumu v oblasti predikce předčasného porodu pomocí potenciální biomarkerů v oblasti prenatalní diagnostiky. Z těchto 64 potenciálních biomarkerů není v současné době žádný využíván v klinické praxi, což ukazuje na hlavní kámen úrazu v této oblasti výzkumu a to, že pouhá explorativní fáze výzkumu v této oblasti nestačí, kandidáty je nutné validovat a verifikovat, aby mohly být použity v klinické praxi. Touto fází bohužel projde málo kandidátů, a tak k vytvoření potenciálního panelu biomarkerů předčasného porodu ještě nedošlo. Současné možnosti proteomických technologií jsou však v tomto oboru krok správným směrem.

V současné době je v klinické praxi využívána kombinace biomarkerů a dalších predikčních faktorů. Je to tedy kombinace anamnézy (viz rizikové faktory v kap. 2), cervikovaginální screening délky děložního hrdla a analýza biomarkerů fFN (fetální fibronektin), IGFBP-1 (insulin like growth factor binding protein či jeho fosforylovaná část) a PAMG-1 (placentální alpha mikroglobulin). Jednotlivé biomarkery jsou popsány v kapitole 2. Vždy je nutné výsledky analýzy zohlednit v celkové anamnéze. Rozhodujícím faktorem je zatím stále délka děložního hrdla (do 30. tt, pak se již fyziologicky zkracuje a jeho měření není tolik vypovídající), často v kombinaci s kultivací stěru z děložního hrdla. U symptomatických žen pomáhá kombinace těchto faktorů s velkou přesností riziko předčasného porodu odhalit a je možné tomu následné těhotenství přizpůsobit. U žen asymptomatických (bez zvýšeného rizika vyplývajícího z anamnézy či jiných rizikových faktorů) je predikční hodnota výrazně nižší [4].

V roce 2017 byla vyvinuta aplikace QUIPP app, jejímž cílem je přesnější predikce rizika sPTB. Využit se dá k určení rizika u asymptomatických pacientek v období v období týdnů 18+0 až 36+6 a u symptomatických těhotných v období 23+0 až 34+6. Zhodnocení rizika probíhá pomocí algoritmů na základě vyhodnocení anamnézy a rizikových faktorů (předchozí sPTB, pPROM, potrat ve II. trimestru, operace na děložním hrdle, dvojčetná gravidita) s hodnotou fFN a délkou děložního hrdla získanou transvaginálním ultrazvukem. Z těchto údajů aplikace na podkladě statistických modelů vypočítá procentuální riziko sPTB do 1/2/4 týdnů a sPTB před 30/34/37 týdnem těhotenství. Podle studií analyzující tuto aplikaci se takto výrazně snižuje počet pacientek, které by byly jinak zatíženy zbytečnou intervencí místo pouhého ambulantního sledování. Výsledky je ovšem třeba ověřit na rozsáhlejší souboru pacientek [4, 72].

Současná kritéria jsou sice u určité skupiny pacientek schopná částečně riziko odhalit, mají ovšem stále nízkou specifitu. Biomarkery jako je fFN, IGFBP-1 a PAMG-1 se mohou využít jen ve specifických situacích, a i tak nejsou zcela průkazné. Ultrazvukové měření děložního hrdla představuje dobře zavedenou metodu predikce předčasného porodu. Nicméně senzitivita a pozitivní predikční hodnota ultrazvukové cervikometrie zůstává stále relativně neuspokojivá. Problémem i nadále zůstává, jak odhalit riziko u dvou třetin PB, které tvoří asymptomatické ženy. Přes veškerou snahu mnoha výzkumných skupin z různých vědeckých oborů nebyl panel dysregulovaných markerů ještě sestaven. Poznatky z těchto studií ovšem přispívají k pochopení komplexity předčasného porodu a stále nás posouvají dál.

## 4. Experimentální část

Cílem této práce bylo pomocí retrospektivní proteomické analýzy odhalit potenciální kandidáty biomarkerů předčasného porodu. K tomuto účelu byly použity vzorky plodových vod odebraných transabdominální amniocentézou mezi 14. - 17. týdnem těhotenství. Ze vzorků byly odstraněny vysoce zastoupené proteiny a takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

### 4.1. Charakterizace souboru pacientek

Od září 2008 do září 2011 byla u celkem 1546 žen provedena transabdominální amniocentéza ve fakultní nemocnici Sahlgrenska University Hospital/stra v Gothenburgu (védsko). Z tohoto množství vzorků nemohlo být celkem 921 vzorků zařazeno do studie kvůli nesouhlasu pacientek a dalších 18 bylo vyloučeno buď kvůli podstoupení potratu při prokázání chromozomálních abnormalit plodu (n12) anebo z důvodů přechodu pacientky pod jiné zdravotní středisko pro následující péči. V celkovém souboru zůstalo tedy 607 pacientek. Z tohoto souboru celkem 38 (6,3 %) porodilo předčasně, 29 spontánně a 9 indukovaně. Ze skupiny spontánních předčasných porodů bylo následně vyloučeno 15 pacientek, a to z důvodů závažných onemocnění u matky (hypothyroidismus, silné astma, deformace dělohy, cukrovka 1.typu), výrazného zbarvení odebrané plodové vody či administrativních chyb při příjmu a zápisu odběru. Z kontrolní skupiny byly vyřazeny pacientky s chronickým onemocněním, cukrovkou a porodu po termínu. Ze zbylých 381 pacientek bylo náhodně vybráno 40 vzorků do kontrolní skupiny. Pro tento projekt bylo tedy díky spolupráci s Fakultní nemocnicí Sahlgrenska Oddělení porodnictví a gynekologie, Gothenburg ve védsku získáno 64 vzorků plodových vod. Všechny vzorky plodových vody byly odebrány při vyšetření transabdominální amniocentézou a to mezi 14. - 17. týdnem těhotenství. Indikací pro odběr plodové vody byl vyšší věk matky, abnormální hodnoty screeningového vyšetření či rodinná historie chromozomálních abnormalit. Odběr plodové vody pro výzkumné účely byl schválen etickou komisí a souhlas pacientky vyjádřen informovaným souhlasem. Při odběru vzorků byly zaznamenány tyto údaje: věk matky při odběru, gestační stáří plodu při odběru a počet předchozích těhotenství. Po porodu byl zaznamenán gestační věk novorozence a porodní jeho váha. Podle gestačního stáří při porodu byly vzorky rozděleny do dvou skupin – case a control. Pacientky ve skupině case – pozitivní skupině, porodily před ukončeným 37. týdnem.

Pacientky, které porodily po 37. Týdnu, jsou zařazeny ve skupině control – kontrolní skupině. Tyto informace jsou zpracovány v tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 5: Charakterizace souboru pacientek

Skupina (case 1/ control 0)	Věk matky při odběru (roky)	Gestační stáří při odběru (dny)	Počet předchozích těhotenství	Gestační stáří při porodu (dny)	Porodní váha (gramy)
1	36	117	1	239	2430
0	36	105	2	279	3550
0	31	106	1	272	4080
0	34	109	1	280	3435
1	38	117	1	249	2645
0	32	107	0	286	3380
0	39	108	4	277	3475
0	36	115	0	269	3100
0	37	106	0	275	3680
0	40	110	2	292	4695
0	35	112	1	287	3460
0	35	109	2	274	3275
0	37	107	2	271	3185
1	41	109	1	238	2765
0	38	118	0	288	3660
0	37	110	1	293	3845
1	37	107	1	257	2835
0	31	111	0	284	3245
0	39	114	0	280	3570
0	35	114	0	292	3895
0	38	115	0	283	3175
0	36	116	1	281	4120
0	32	107	0	272	2945
0	38	109	1	269	3600
1	34	112	0	221	1945
1	41	106	6	255	2910
1	38	111	1	258	2445
0	37	116	0	284	3810
1	41	109	0	258	2900
0	36	106	3	269	3175
0	39	117	1	272	3530

Skupina (case 1/ control 0)	Věk matky při odběru (roky)	Gestační stáří při odběru (dny)	Počet předchozích těhotenství	Gestační stáří při porodu (dny)	Porodní váha (gramy)
0	37	106	0	270	2960
1	38	107	2	258	2505
0	36	113	1	274	3540
0	38	111	1	289	3515
1	37	113	0	219	1415
0	33	113	1	273	3400
1	37	102	2	258	2800
0	36	108	1	283	3745
0	36	107	1	292	3680
0	32	108	1	272	3080
0	35	114	2	288	4440
0	43	115	2	279	3655
1	43	110	1	227	2185
0	40	111	2	279	2875
1	38	103	3	235	3025
1	39	105	0	256	2305
0	36	106	1	281	3505
1	42	115	2	236	2385
0	37	105	2	275	3130
1	33	117	0	228	2820
0	36	114	2	289	3875
0	35	110	2	279	3445
0	36	113	1	282	3600
0	39	105	2	288	4730
0	27	110	0	283	3095
1	43	107	3	236	2245
1	33	104	1	253	3410
1	34	104	2	250	2380
1	39	116	0	243	2475
1	35	114	0	258	3370
1	36	119	0	258	2860
1	36	105	4	250	3040
1	35	112	0	255	2375

Tabulka (Tabulka 6) znázorňuje statisticky zpracované údaje z předchozí tabulky. Věk pacientek se pohyboval v době odběru mezi 27–43 lety. Gestační stáří plodu při odběru v rozmezí

102–119 týdnů ani počet předchozích těhotenství (0–6) není pro rozdělení do pozitivní a kontrolní skupiny statisticky významné. Věk matky při odběru plodové vody, v průměru o rok vyšší v pozitivní skupině, naopak statisticky významné je. Což se shoduje s rizikovými faktory, kterým právě vyšší věk matky je.

Tabulka 6: Statistika souboru pacientek

Statistika	Věk matky při odběru (roky)	Gestační stáří při odběru (dny)	Počet předchozích těhotenství	Gestační stáří při porodu (dny)	Porodní váha (gramy)
<b>Celý soubor pacientek</b>					
<b>Minimální hodnota</b>	27	102	0	219	1415
<b>Maximální hodnota</b>	43	119	6	293	4730
<b>Střední hodnota</b>	36.63	110.3	1.172	267.2	3197
<b>Směrodatná odchylka</b>	3.047	4.296	1.189	19.42	633.6
<b>Pozitivní skupina (case)</b>					
<b>Minimální hodnota</b>	33	102	0	219	1415
<b>Maximální hodnota</b>	43	119	6	258	3410
<b>Střední hodnota</b>	37.67	110	1.292	245.6	2603
<b>Směrodatná odchylka</b>	3.002	5.12	1.517	12.88	441.9
<b>Kontrolní skupina (control)</b>					
<b>Minimální hodnota</b>	27	105	0	269	2875
<b>Maximální hodnota</b>	43	118	4	293	4730
<b>Střední hodnota</b>	36	110.4	1.1	280.1	3554
<b>Směrodatná odchylka</b>	2.935	3.781	0.9554	7.318	430.7
<b>P hodnota t test (case vs. control)</b>	<b>0.033</b>	<b>0.7495</b>	0.5368	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>statisticky významné (p &lt;0.05)</b>	<b>ano</b>	ne	ne	<b>ano</b>	<b>ano</b>



## 4.2. Materiál a metody

### 4.2.1. Příprava vzorků

Ultrazvukem kontrolovanou amniocentézou byly odebrány 3 ml plodové vody. Po odběru byly vzorky označeny a do dalšího zpracování skladovány při teplotách 4–8 C. Jednotlivé fáze při manipulaci a skladování vzorků probíhalo vždy v jedné laboratoři a podle standardizovaného protokolu.

Materiál:

- 64 vzorků plodových vod
- Centrifugační filtry – Centrifugal filter devices PVDF 0,22 m (Ultrafree-MC) - pro objem pod 0,5 ml, MILLIPORE, Merck, Německo
- Destilovaná voda
- BCA (Bicinchionic Acid Assay) proteinový kit, Pierce, USA
- BSA (Bovine Serum Albumin) – zásobní roztok 1 mg/ml, Merck, Německo
- Inhibitor proteáz, Complete EDTA free, ROCHE diagnostics, výca rsko

Postup:

Vzorky byly odebrány z původní kryozkumavky do nové mikrozukumavky. Ke každému vzorku bylo přidáno 8 l inhibitoru proteáz, aby nedocházelo ke svévolnému štěpení proteinů a vzorky byly následně zvortexovány a krátce stočeny. Po stočení byly přemístěny na filtr a centrifugací při 4 C po dobu 20 minut při 12000 g byly ze vzorků odstraněny buňky a další makročástice. Supernatant byl přemístěn do nové zkumavky. Celkové množství proteinů v každém vzorku bylo stanoveno bicinchoninovou metodou (BCA) na 10 l každé ho vzorku. Dle pokynů výrobce byl připraven zásobní roztok BCA. Do jamek destičky byl napipetován zásobní roztok BCA a doplněn vodou na finální 2–10 mg/ml. Do jamek bylo napipetováno 9 l vody a 1 l vzorku, smícháno s 190 l činidla. Vzorky byly inkubovány při 37 C za stálého míchání (450 rpm) po dobu 30 min a po zchlazení proměřeny při 562 nm. Na základě měření bylo vypočítáno přesné množství celkového proteinu v jednotlivých vzorkách (Tabulka 7, část BCA).

Zbylý odebraný supernatant byl rozdělen na alikvoty po 200 l a uložen pro další zpracování při -80 C.

#### 4.2.2. Imunodeplece

Z každého vzorku byl následně odebrán objem odpovídající 400 g proteinů, údaje jsou uvedené v tabulce (Tabulka 7). Vzorky byly pomocí centrifugačních filtrů převedeny do pufru MARS (Multi Affinity Removal System) A, zakoncentrovány a zamrazeny před další analýzou. Ze všech vzorků bylo odstraněno HPLC metodou na koloně MARS Hu14 4.6x100mm přibližně 90 % celkového obsahu proteinů.

Materiál:

- Vzorky plodových vod
- Centrifugační filtry – AMICON Ultra Centrifugal Filters Ultracel K, 3 kDa, Merck, Německo
- Skleněná injekční stříkačka Hamilton, objem 250  $\mu$ l, Merck, Německo
- Automatické pipety a sterilní špičky, Eppendorf, Německo
- Mikrozkušavky, 0,2 – 1,5 ml, Axygen, USA
- Ultračistá voda, LC-MS grade, Thermo Fisher, USA
- Methanol, LC-MS grade, Honeywell Fluka, USA
- MARS (Multiple Affinity Removal System) pufrů A a B, Agilent Technologies, USA
- Kolona MARS Hu-14 (Multiple Affinity Removal Column Human 14); 4,6 x 100 mm; Agilent Technologies, USA
- Kryozkušavky, 5 ml, Eppendorf, Německo

Tabulka 7: Přehledová tabulka celkového množství proteinu ve vzorkách a objemy ke zpracování

Číslo vzorku	BCA		I) Celkový objem 2 ml		II) Celkový objem 200μl		
	Case/control (1/0)	BCA (mg/ml)	Objem vzorku (μl)	Pufr A (μl)	vzorek (μl)	Vzorek (μl)	pufr A (μl) + 10 μl
1	1	4,32	169	1907	93	85	105
2	0	4,51	173	1911	89	80	110
36	0	4,04	172	1901	99	100	90
52	0	3,65	172	1890	110	125	65
64	1	4,48	169	1911	89	80	110
78	0	3,65	172	1890	110	100	90
95	0	4,28	173	1907	93	85	105
136	0	2,43	168	1836	164	105	85
150	0	3,45	171	1884	116	100	90
187	0	2,63	169	1848	152	75	115
193	0	3,20	171	1875	125	90	100
203	0	3,33	171	1880	120	85	105
220	0	3,63	172	1890	110	95	95
229	1	3,34	166	1880	120	90	100
238	0	2,70	169	1852	148	90	100
260	0	3,44	171	1884	116	90	100
276	1	4,23	169	1905	95	90	100
283	0	4,96	173	1919	81	105	85
309	0	5,72	174	1930	70	95	95
340	0	5,00	173	1920	80	105	85
366	0	2,90	170	1862	138	105	85
403	0	6,81	175	1941	59	100	90
407	0	6,08	174	1934	66	105	85
415	0	3,93	172	1898	102	90	100
417	1	3,91	168	1898	102	100	90
418	1	3,37	166	1881	119	150	40
422	1	4,13	168	1903	97	115	75
439	0	4,44	173	1910	90	95	95
456	1	5,14	170	1922	78	110	80
459	0	4,06	172	1902	98	105	85
485	0	4,39	173	1909	91	90	100
503	0	3,82	172	1895	105	105	85
506	1	6,79	172	1941	59	80	110
533	0	6,22	174	1936	64	115	75
540	0	3,56	171	1888	112	100	90

BCA			Objem vzorku ( $\mu$ l)	I) Celkový objem 2 ml		II) Celkový objem 200 $\mu$ l	
Číslo vzorku	Case/control (1/0)	BCA (mg/ml)		Pufř A ( $\mu$ l)	vzorek ( $\mu$ l)	Vzorek ( $\mu$ l)	pufř A ( $\mu$ l) + 10 $\mu$ l
562	1	3,42	166	1883	117	100	90
565	0	3,77	172	1894	106	90	100
572	1	3,17	165	1874	126	100	90
588	0	3,93	172	1898	102	95	95
604	0	3,72	172	1892	108	100	90
618	0	4,01	172	1900	100	95	95
636	0	4,97	173	1920	80	90	100
657	0	4,04	172	1901	99	95	95
673	1	4,69	170	1915	85	95	95
682	0	5,70	174	1930	70	105	85
687	1	4,39	169	1909	91	100	90
695	1	2,87	164	1861	139	80	110
696	0	4,18	173	1904	96	80	110
714	1	4,73	170	1915	85	80	110
744	0	3,13	170	1872	128	95	95
746	1	8,85	174	1955	45	100	90
753	0	3,94	172	1898	102	105	85
766	0	3,97	172	1899	101	100	90
795	0	5,21	174	1923	77	90	100
839	0	4,03	172	1901	99	100	90
840	0	5,31	174	1925	75	115	75
892	1	3,63	167	1890	110	100	90
940	1	2,56	162	1844	156	95	95
980	1	3,28	166	1878	122	90	100
988	1	3,85	168	1896	104	75	115
1029	1	4,21	169	1905	95	100	90
1097	1	5,71	171	1930	70	95	95
1112	1	2,94	164	1864	136	95	95

#### Postup:

Ke zpracování vzorků pomocí imunodeplece bylo odebráno 400 g proteinů z každého vzorku do AMICON filtru. Celkový objem byl doplněn MARS pufřem A na 4 ml (Tabulka 7, část I). Vzorky byly stočeny (4C, 7000 rpm, fi xní rotor) asi 30 minut, dokud ve filtru zbylo méně než 140 l. Po stočení byl pomocí Hamilton střikačky odebrán vzorek z filtru do nové mikrozkušavky a zaznamenám jeho přesný objem. Zbytek vzorku byl se střikačky vypláchnut 10 l pufřem

A a přidán ke vzorku. Celkový objem vzorku byl pufr A doplněn na 200 l ( Tabulka 7, část II).  
Všechny vzorky byla zmrazeny na -80 C.

Samotná imunodeplece byla provedena na HPLC přístroji Alliance 2695 Separation Module (Waters, USA). Příprava přístroje odpovídala manuálu výrobce. Bylo proveden proplach a všechny kapiláry byly postupně převedeny z methanolu do vody a následně do pufru A pro imunodepleci. Po skončení analýzy byl postup opačný, z pufrů do vody a následně do methanolu.

Nastavení metody bylo provedeno v programu MassLynx dle následujících parametrů:

- Mobilní fáze: MARS pufr A, MARS pufr B
- Kolona: MARS Hu-14; 4,6 x 100 mm
- Přístroj: Alliance 2695 Separation Module
- Průtok: 0,125 ml/min
- Výchřev kolony: 22 C 2 C
- Maximální tlak na koloně: 60 bar
- Výchřev autosampleru: 4 C 5 C
- Vlnová délka pro detekci: 280 nm
- Objem nástřiku vzorku: 190 l
- Gradient: 0-100 % B, 45 min, viz Tabulka 8

Tabulka 8: Gradient metody pro imunodepleci vzorků

čas [min]	% pufr B	průtok [ml/min]
0,00	0	0,125
21,00	0	0,125
22,00	0	1,000
24,00	0	1,000
24,01	100	1,000
31,00	100	1,000
31,01	0	1,000
43,00	0	1,000
45,00	0	0,125

Vzorky byly zpracovány v sérii po osmi. Před každou sérii byl analyzován pufr A jako blank. Vzorky byly před analýzou rozmrazeny ve vodní lázni a řádně promíchány. Pro analýzu bylo použito 190 l vzorku. Frakce byly jímány mezi 5. až 22. minutou pomocí automatického sběrače

frakcí do kryozkumavek umístěných na ledu. Celkový objem jímané frakce byl cca 3 ml. Vzorky byly po analýze zmrazeny na -80 C.

Po dokončení imunodeplece byly vzorky rozmrazeny ve vodní lázni, řádně promíchány a pomocí AMICON filtrů opět převedeny z pufru do vody. Vzorky byly přemístěny do filtru, stočeny (20 min, 4 C, 7500 rpm). Dále byly do filtru ke vzorkům přidány 4 ml vody, filtrát byl odstraněn a vzorky opět stočeny (55 min, 4 C, 7500 rpm). Vzorek z filtru byl přenesen do mikr ozkumavky (přibližný objem vzorku byl 100 l), přesný objem zaznamenám a doplněn v odou na celkový objem 140 l. Poté byly vzorky zmrazeny na -80 C.

Z technických důvodů a chyb během imunodeplece musely být z dalšího zpracování vyřazeny 4 vzorky a to vzorky 136, 485 a 503 byly z kontrolní skupiny, vzorek 1029 ze skupiny předčasného porodu. **Dále byla studie prováděna na 60 vzorkách, 37 kontrol a 23 pozitivních vzorků.**

#### 4.2.3. Enzymatické štěpení a značení vzorků

K enzymatickému štěpení vzorků byly z důvodů vyšší efektivity použity dva typy enzymů, lyzináza C a trypsin. Vzorky byly následně odsoleny a označeny izobarickými značkami iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) 4-plex umožňující kvantitativní analýzu 4 vzorků současně.

Materiál:

- 60 vzorků plodových vod po imunodepleci
- TCEP (tris-(2-carboxyethyl) phosphine), Sigma-Aldrich, USA
- RapiGest SF (RpG), Waters, USA
- TEAB (triethylammonium bicarbonate) 1 M (buffer; pH 8,5), Sigma-Aldrich, USA
- MMTS (S-methyl methanethiosulfonate) 200 mM v isopropanolu, Honeywell Fluka, USA
- Rekombinantní enzym lyzináza C (rLysC), Mass Spec, Promega, USA
- Enzym trypsin, Mass Spec, Promega, USA
- HPLC voda, Sigma-Aldrich, USA
- Pipety a sterilní špičky
- TFA (trifluoroacetic acid), čistota 99 %, pro HPLC, Sigma-Aldrich, USA
- iTRAQ KIT 4-plex, AB Sciex, USA
- EtOH z iTRAQ kitu

- MeOH, Honeywell Fluka, USA
- ACN, LS –MS, Honeywell Fluka, USA
- SPE kolonky Empore, Sigma-Aldrich, USA
- CHCA matrix ( -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), Sigma-Aldrich, USA
- Axygen mikrozkušavky, Corning, USA
- SPE tips – Cleanup C18 pipette tips, Agilent, USA

Před samotným štěpením byly připraveny zásobní roztoky redukčního činidla TCEP, které se využije k přerušení vazeb mezi S-S můstky, MMTS, které zabraňuje opětovnému spojení S-S můstků, RpG, který napomáhá lepšímu rozpuštění vzorků. Příprava vzorků probíhala podle tabulky (Tabulka 9).

Tabulka 9: Přehledová tabulka pro přípravu vzorků ke štěpení

	Koncentrace zásobního roztoku (mM)	Objem zásobního roztoku (μl)	Konečná koncentrace (mM)	Celkový objem pro přípravu 60/70 vzorků (μl)
<b>Vzorek</b>		42		2520
<b>RpG (%)</b>	1	10	<b>0,1</b>	600 / <b>700</b>
<b>TEAB</b>	1000	25	<b>250</b>	1500/ <b>1750</b>
<b>TCEP</b>	50	10	<b>5</b>	600/ <b>700</b>
<b>MMTS</b>	200	5	<b>10</b>	300
<b>LysC</b>		2		120
<b>Trypsin</b>		2		120
<b>Objem</b>		96		
<b>Voda</b>		4		
<b>Cílový objem</b>		<b>100</b>		

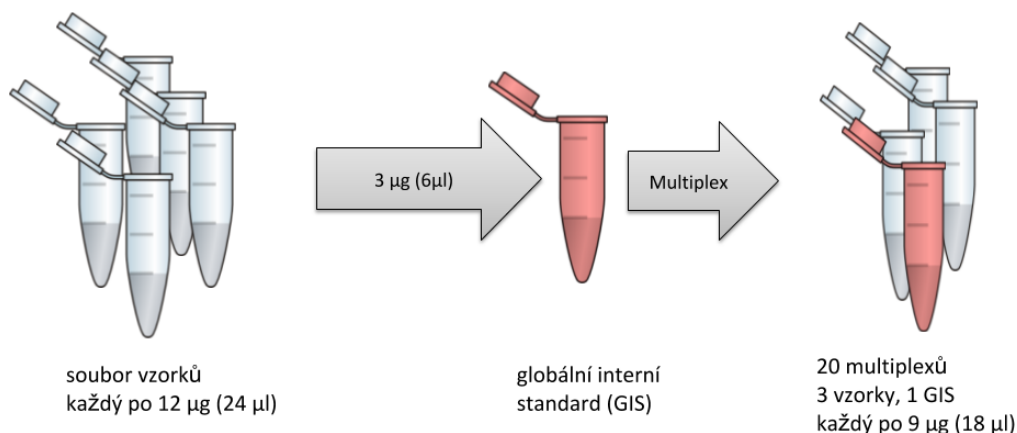
Po připravení všech zásobních roztoků byl vytvořen směsný roztok TEAB, RpG a TCEP. Směs byla po smíchání rozpipetována po 45 l do 60 mikrozkušavek. Vzorky byly rozmrazeny ve vodní lázni, zvortexovány a stočeny.

Do každé mikrozkušavky (se 45 l předchozího m ixu) bylo přidáno 42 l vzorku, tedy celkové množství 12 g proteinu.

Směs se při 60 C inkubovala po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byly vzorky zchlazeny na pokojovou teplotu a při pokojové teplotě 10 min inkubovány s MMTS. Ke vzorkům byl přidán enzym rLysC (v poměru 1:50 enzym ku celkovému proteinu) a 4 hod probíhala inkubace při 37 C. Před

zahájením štěpení bylo zkontrolováno pH. Pro správný průběh je potřeba pH 8,5 (v případě nutnosti bylo pH upraveno pomocí TEAB či NaOH). Po uplynutí 4 hod byl ke vzorům přidán enzym trypsin ve stejném poměru 1:50. Opět bylo zkontrolováno pH a vzorky se dále inkubovaly přes noc při 37 C.

Po inkubaci vzorků s enzymy byly vzorky odpařeny do sucha po dobu cca 2 hodin. Vysušené vzorky byly rozpuštěny v 24 l 250 mM TEAB, řádně zvortexovány. Z každého vzorku, který obsahoval 12 g peptidů (24 l) byly odebrány 3 g, tedy 6 l do jedné zkumavky, ze které vznikl globální interní standard (GIS). Ten byl následně rozdělen do 20 mikrozkušavek po 9 g peptidů (18 l) jak je naznačeno na obrázku (Obrázek 13).



Obrázek 13: Schéma přípravy GIS a multiplexů

#### Kontrola enzymatického štěpení:

Před značením byla na malém vzorku GIS provedena kontrola úspěšnosti štěpení. Ze směsného vzorku GIS byly odebrány 4 l, smíchány s 1 l 50% TFA z důvodů snížení pH. Ke vzorku bylo přidáno 10 l SPE pufru A (5 % ACN, 0,1 % TFA) a bylo zkontrolováno pH (mez i 1-2). Vzorek byl hodinu inkubován pro pokojové teplotě, dokud se nevysrážel RpG. Vzorek byl dále odsolen na SPE mikrokolonce (15 l MeOH ekvilibrace, dvakrát promytí 15 l SPE A, vzorek, dvakrát promytí 15 l SPE A, eluce 10 l SPE B (80 % ACN, 0,1 % TFA)). Na MALDI destičku Opti-TOF 384 123 x 81 mm Well Insert (AB Sciex, USA) byl nanesen 1 l vzorku a 1 l matrice CHCA o koncentraci 5 mg/ml. Připravený vzorek byl proměřen na tandemovém hmotnostním spektrometru 4800 MALDI-TOF/TOF (AB Sciex, USA) v refletronovém módu v rozmezí



m/z 750–3000. Pro MS/MS bylo vybráno 12 nejvíce intenzivních peptidových signálů. spěšnost značení byla vyhodnocena v programu ProteinPilot. Výsledky byly vyhodnoceny společně s kontrolou značení uvedeném dále v tabulce (Tabulka 11).

Dle manuálu výrobce byly iTRAQ značky před použitím rozmrazeny, zvortexovány a stočeny. Ke každé bylo přidáno 70 l EtOH. Všechny zkumavky byly uloženy na ledu, aby se zabránilo rychlému vypařování EtOH. Každý vzorek, včetně 20 zkumavek s GIS, byl smíchán 40 l příslušné iTRAQ značky. Označení vzorků v rámci iTRAQ značení a tvorba multiplexů je zobrazena v tabulce (Tabulka 10).

*Tabulka 10: Značení vzorků pomocí iTRAQ značek (levý sloupec – vzorek – ukazuje čísla vzorků, sloupec iTRAQ použitou značku, barevné odlišení bylo zvolené pro přehlednost, odpovídá barvě použitých stojánků na zkumavky, ohraničení tlustými čarami pak značí multiplexy - 3 vzorky jeden GIS)*

Vzorek	iTRAQ značka	Vzorek	iTRAQ značka	Vzorek	iTRAQ značka	Vzorek	iTRAQ značka	Vzorek	iTRAQ značka
<b>1</b>	115	<b>229</b>	115	<b>418</b>	115	<b>604</b>	115	<b>753</b>	115
<b>2</b>	116	<b>238</b>	116	<b>422</b>	116	<b>618</b>	116	<b>766</b>	116
<b>36</b>	117	<b>260</b>	117	<b>439</b>	117	<b>636</b>	117	<b>795</b>	117
GIS (MIX1)	114	GIS (MIX5)	114	GIS (MIX 9)	114	GIS (MIX13)	114	GIS (MIX17)	114
<b>52</b>	115	<b>276</b>	115	<b>456</b>	115	<b>657</b>	115	<b>839</b>	115
<b>64</b>	116	<b>283</b>	116	<b>459</b>	116	<b>673</b>	116	<b>840</b>	116
<b>78</b>	117	<b>309</b>	117	<b>506</b>	117	<b>682</b>	117	<b>892</b>	117
GIS (MIX2)	114	GIS (MIX 6)	114	GIS (MIX10)	114	GIS (MIX14)	114	GIS (MIX18)	114
<b>95</b>	115	<b>340</b>	115	<b>533</b>	115	<b>687</b>	115	<b>940</b>	115
<b>150</b>	116	<b>366</b>	116	<b>540</b>	116	<b>695</b>	116	<b>980</b>	116
<b>187</b>	117	<b>403</b>	117	<b>562</b>	117	<b>696</b>	117	<b>988</b>	117
GIS (MIX3)	114	GIS (MIX7)	114	GIS (MIX11)	114	GIS (MIX15)	114	GIS (MIX19)	114
<b>193</b>	115	<b>407</b>	115	<b>565</b>	115	<b>714</b>	115	<b>1097</b>	115
<b>203</b>	116	<b>415</b>	116	<b>572</b>	116	<b>744</b>	116	<b>1112</b>	116
<b>220</b>	117	<b>417</b>	117	<b>588</b>	117	<b>746</b>	117	<b>1120</b>	117
GIS (MIX4)	114	GIS (MIX8)	114	GIS (MIX12)	114	GIS (MIX 16)	114	GIS (MIX20)	114

Vzorky byly se značkami inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě. Nezreagovaná značka byla po uplynutí inkubace hydrolyzována přidáním 150 l vody a vzorek byl inkubován 30 minut. Po označení GIS byly všechny vzorky GIS (v tabulce MIX 1–20) smíchány, a ještě jednou rozpipetovány do 20 skleněných vialek, aby se eliminovala chyba při značení a GIS byl shodný ve všech multiplexech. Poté byly vzorky dle tabulky (Tabulka 10) smíchány do 20 multiplexů, kde každý multiplex obsahoval 3 vzorky označené 115, 116 a 117 a GIS označený 114. Vzorky byly

odpařeny na objem cca 50 l, naředěny vodou na 100 l. Ke vzorkům byla přidána 50% TFA v objemu, který snížil pH na 1-2 (cca 2 l TFA) ke zhydrolyzování RpG. Vzorky byly inkubovány 1 hod při pokojové teplotě, zvortexovány, stočeny (15 min, 14500 rpm). Po stočení RpG vypadl ve formě pelety. Vzorky byly odsoleny na C18 kolonkách (1 ml MeOH ekvilibrace, dvakrát promytí 1 ml SPE A (5 % ACN, 0,1 % TFA), vzorek, 500 l SPE A, dvakrát promytí 1 ml SPE A, eluce 500 l SPE B (80 % ACN, 0,1 % TFA) ).

Z každého vzorku bylo odebráno 20 l z důvodů kontroly kvality značení a k ověření, zda celkové množství proteinu ve vzorku odpovídá výpočtům. Tyto vzorky byly označeny T1 – T20.

Multiplexy byly odpařeny do sucha a uloženy při -20 C před další analýzou.

#### Kontrola kvality značení na vzorcích T1 – T20:

K 1 l každého vzorku byl přidán 1 l matrice CHCA (5 mg/ml v 80% ACN, 0,1% TFA). Těchto 20 vzorků (ozn. K1 – K20) bylo proměřeno na tandemovém hmotnostním spektrometru 4800 MALDI-TOF/TOF (AB Sciex, USA) dle výše popsaných parametrů. Výsledky byly opět vyhodnoceny v programu ProteinPilot. Z tabulky (Tabulka 11) je ve sloupci sekvence vidět provedená kontrola štěpení. Nejvíce spekter bylo získáno z peptidů správně štěpených pomocí trypsinu a LysC. Dále je vidět, že všechny tyto peptidy nesou iTRAQ skupinu na N – konci.

Tabulka 11: Výsledky MALDI měření – ověření štěpení a iTRAQ značení

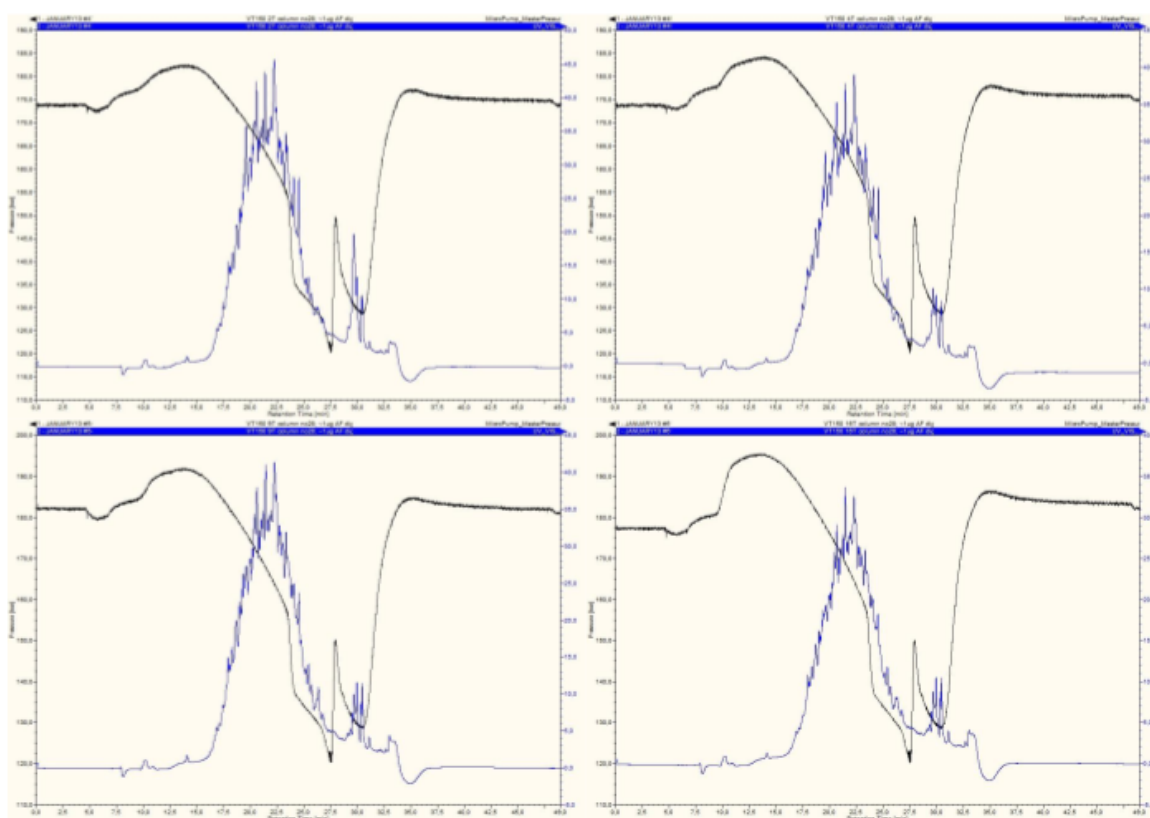
Spektrum	Hmota	m/z	Sekvence	Modifikace	Spolehlivost %
3	999,5399	1000,5472	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	93
9	999,5316	1000,5388	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	93
5	999,5413	1000,5485	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	94
14	999,5369	1000,5441	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	96
15	999,5526	1000,5599	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	96
4	999,5396	1000,5468	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	98
2	1806,7791	1807,7864	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99
3	1806,7822	1807,7896	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99
4	1806,7863	1807,7936	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99
4	1840,6659	1841,6732	EYCGVPGDGDEELLR	iTRAQ4plex@N-term, Methylthio(C)@3	99
4	2051,8491	2052,8564	GECVPGEQEPEPILIPR	iTRAQ4plex@N-term, Methylthio(C)@3	99
5	1806,7866	1807,7939	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99
10	1673,7993	1674,8066	ALPGEQQPLHALTR	iTRAQ4plex@N-term	99
12	1806,8101	1807,8174	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99
12	1840,6917	1841,699	EYCGVPGDGDEELLR	iTRAQ4plex@N-term, Methylthio(C)@3	99
12	2051,864	2052,8713	GECVPGEQEPEPILIPR	iTRAQ4plex@N-term, Methylthio(C)@3	99
13	1806,7836	1807,7909	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99
13	999,5432	1000,5504	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	99
13	1822,7708	1823,7781	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term, Oxidation(M)@9	99
13	1673,801	1674,8083	ALPGEQQPLHALTR	iTRAQ4plex@N-term	99
14	1673,8062	1674,8135	ALPGEQQPLHALTR	iTRAQ4plex@N-term	99
15	1806,8003	1807,8076	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99
16	1840,6844	1841,6918	EYCGVPGDGDEELLR	iTRAQ4plex@N-term, Methylthio(C)@3	99
16	999,5522	1000,5595	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	99
18	999,5463	1000,5536	AFRPLPR	iTRAQ4plex@N-term	99
18	1806,8049	1807,8123	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99
19	1840,6886	1841,6959	EYCGVPGDGDEELLR	iTRAQ4plex@N-term, Methylthio(C)@3	99
19	1806,8148	1807,8221	VLVEDDEIMQGFIR	iTRAQ4plex@N-term	99

Kontrola obsahu celkového proteinu (po naštěpení ve formě peptidů) na souboru vzorků T1 – T20:

Dle předpokladů každý vzorek T1 – T20 obsahuje přibližně 1,5 g peptidů (z původního multiplexu obsahujícího 36 g/ 500 l bylo odebráno 20 l, tedy cca 1,5 g peptidů).

Ke každému vzorku bylo přidáno 10 l 5% ACN, 0,1% TFA. Vzorky byly zvortexovány, stočeny a 10 min inkubovány při pokojové teplotě v termomixéru, aby došlo k řádnému rozpuštění. Vzorky byly přeneseny do skleněných vialek s insertem. Vzorky byly proměřeny na RP-HPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher, USA) pomocí 60 minutové metody (s 25 min gradientem) při nástřiku 6,6 l. Vzorky byly podle intenzity porovnány mezi sebou a se standardem.

Dle maximálního UV signálu měly vzorky přibližně stejný obsah peptidů (intenzita UV/VIS 30-45 AU), který v porovnání se standardem (mix buněk o koncentraci 1 g/l) odpovídal vypočtenému obsahu. Obrázek 14 ukazuje porovnání 4 vzorků, zbylé výsledky jsou uvedeny ve sekci přílohy (Příloha 1).



Obrázek 14: Porovnání UV záznamu po LC analýze multiplexů 2, 4, 9 a 16

#### 4.2.4. Bazická frakcionace vzorků

Ke snížení komplexity směsi byla kromě imunodeplece dále použita dvourozměrná frakcionace. První stupeň frakcionace byl proveden při bazickém pH, druhý stupeň při alkalickém pH.

Materiál:

- Naštěpené a označené vzorky plodových vod (20 multiplexů)
- ACN, LS –MS, Honeywell Fluka, USA
- Amoniak - 28%, Sigma-Aldrich, USA
- FA, Honeywell Fluka, USA
- Voda – HPLC, Sigma-Aldrich, USA

Před zahájením analýzy byly připraveny mobilní fáze (mobilní fáze A–2% ACN, 20 mM NH<sub>4</sub>FA, pH 10; mobilní fáze B–80% ACN, 20 mM NH<sub>4</sub>FA, pH 10), sonikovány a uloženy do lednice. Přístroj UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher, USA) byl připraven na analýzu – byly provedeny proplachy kapilár, jehly a smyček. Byla zapojena kolona Xterra MS C18, 3,5 m, 2,1x100 mm (Waters, USA) dle pokynů výrobce. Z každého multiplexu bylo odebráno 25 l vzorku, smícháno s 50 l mobilní fáze A, takže výsledná koncentrace vzorků odpovídá přibližně 0,3 g/l. Jako standard byl použit naštěpený protein cytochrom C (CytC) o koncentraci 0,5 g/l. Vzorky byly analyzovány v následujícím pořadí: 2x Blank (mobilní fáze A), CytC, 5x vzorek. Blanky byly analyzovány 15 min metodou s 5 min gradientem 0–50 % B (metoda A 15 min), CytC a vzorky 40 min metodou s 30 min gradientem 3–50 % B (metoda B 40 min). Vzorky byly analyzovány při průtoku 0,300 ml/min. Při analýze CytC bylo na kolonu nastříknuto 10 l vzorku, u vzorků plodových vod bylo nastříknuto 70 l vzorku.

- Mobilní fáze: A–2% ACN, 20 mM NH<sub>4</sub>FA, pH 10; B–80% ACN, 20 mM NH<sub>4</sub>FA, pH 10
- Kolona: Xterra MS C18, 3,5 m, 2,1 x1 00 mm
- Přístroj: UHPLC UltiMate 3000
- Průtok: 0,300 ml/min
- Výchřev kolony: 40 C
- Maximální tlak na koloně: 400 bar
- Výchřev autosampleru: 5 C

- Vlnová délka pro detekci: 214 nm
- Objem nástřiku vzorku: 70 l
- Objem nástřiku standardu: 10 l
- Délka metody: 15 min (metoda A), 40 min (metoda B),
- Gradient: Tabulka 12– metoda A, Tabulka 13– metoda B

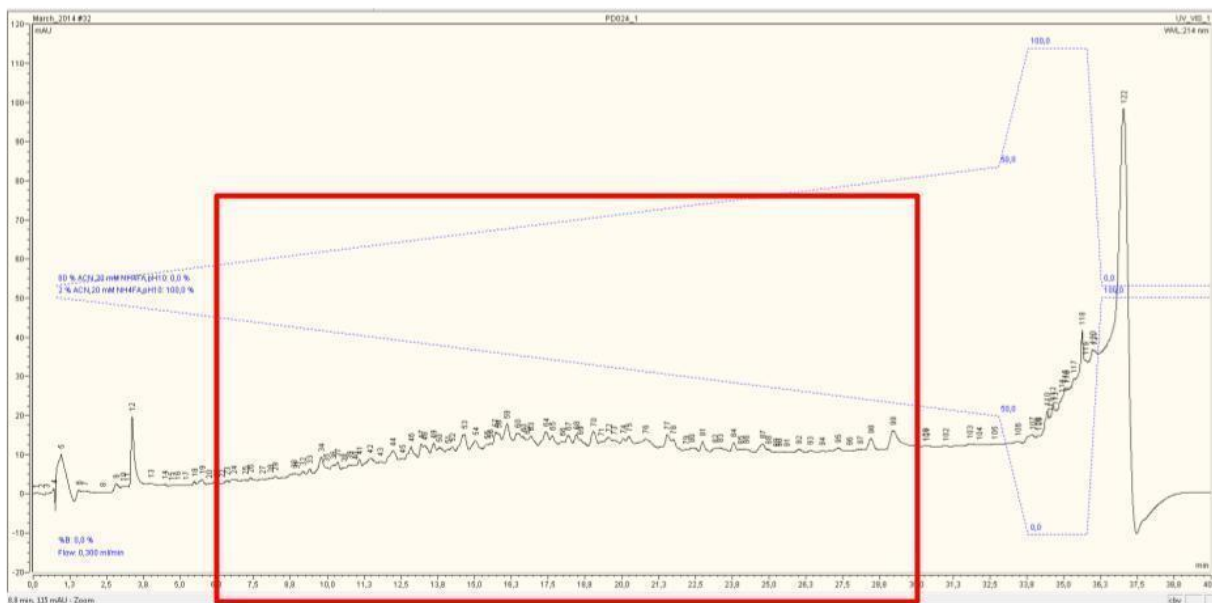
Tabulka 12: Gradient metody pro bazickou LC analýzu vzorků. Metoda A 15 min pro analýzu blanku

čas [min]	% pufr B	průtok [μl/min]
0	0	0,3
2	0	0,3
7	50	0,3
8	100	0,3
10	100	0,3
10,5	0	0,3
15	0	0,3

Tabulka 13: Gradient metody pro bazickou LC analýzu vzorků. Metoda B 40 min pro analýzu vzorků a standardu CytC

čas [min]	% pufr B	průtok [μl/min]
0	0	0,3
2	3	0,3
32	50	0,3
33	100	0,3
35	100	0,3
35,5	0	0,3
40	0	0,3

Z každého vzorku byly jímány frakce mezi 6. - 30. minutou po 45 s do 96 jamkové destičky. Chromatografický záznam je na obrázku (Obrázek 15).



Obrázek 15: Chromatografický záznam bazické LC analýzy vzorků

Dle následujícího schématu (Obrázek 16) byly po dokončení analýzy smíchány frakce do osmi vzorků. Z každého vzorku, který byl frakcionován na 32 frací bylo ve výsledku 8 frací, a to u každého vzorku z celkových 20 multiplexů. Všechny vzorky byly po smíchání odpařeny a zamrazeny na -20 C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25								
B	2	10	18	26								
C	3	11	19	27								
D	4	12	20	28								
E	5	13	21	29								
F	6	14	22	30								
G	7	15	23	31								
H	8	16	24	32								

Obrázek 16: Schéma pro kombinaci vzorků po bazické separaci

#### 4.2.5. LC-MS/MS analýza

Před samotnou analýzou byly připraveny všechny mobilní fáze, zvláště na nanoHPLC (pro přehlednost zde označeny jako nano A a nano B) a zvláště na nástřik vzorků a jejich nanesení na kolonu (pro přehlednost zde označeny jako load A a load B) a roztoky pro oplachy. Složení mobilních fází je dále popsáno. Byly provedeny proplachy a testy tlaku a viskozity mobilních fází dle pokynů výrobce. Analýza byla provedena na přístroji UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher, USA) spojeném s hmotnostním spektrometrem Q Exactive plus (Thermo Fisher, USA).

Přípravy roztoků pro UHPLC UltiMate 3000:

- Nano A (2% ACN, 0,1% FA)
- Nano B (80% ACN, 0,1% FA)
- Load A (2% ACN, 0,1% TFA)
- Load B (100% ACN)
- Oplach pístů (50% MeOH, 0,1% FA)
- Oplach autosampleru (25% ACN, 0,1% FA)

Všechny roztoky byly po přípravě sonikovány v ultrazvuku. Byl proveden proplach systému (purging) nejprve obou bloků nano pumpy 50 % nano A, 50 % nano B po dobu 30 min, dále proplach flowmetru 60 min, a nakonec proplach loading pumpy 50 % load A, 50 % load B po dobu 600 s průtokem 2000 l/min.

Následně byla do systému zapojena kolona Acclaim PepMap RSLC, 75 m, 50 cm, C 18, 2 m a předkolonka PepMap 100 ViperTrap, 3 m, 100 a dle pokynů výrobce ekvilibrována.

Dále byla provedena kalibrace hmotnostního spektrometru.

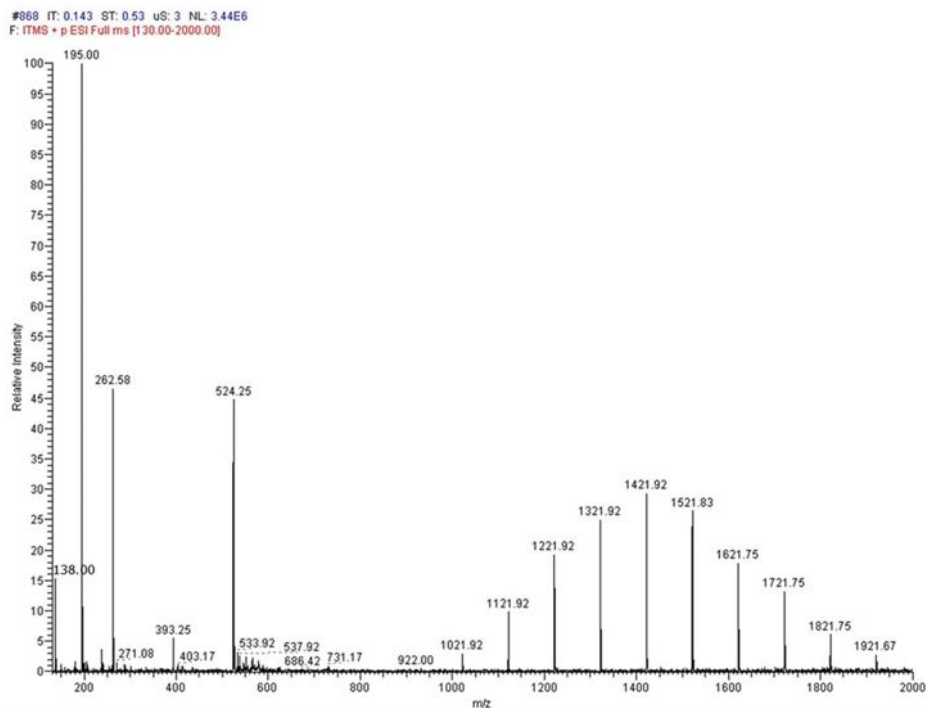
Kalibrace hmotnostního spektrometru Q Exactive plus:

- Kalibrant Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution, Thermo Fisher Scientific, USA
- MeOH, LC-MS grade, Fluka, USA



Proteomická analýza byla provedena pouze v pozitivní modu, kalibrace se tedy provádí pouze na pozitivní kalibrant. Při kalibraci se po ustálení celkového proudu iontů (TIC) se provádí evaluace a kalibrace.

V kalibrantu se objevují následující ionty: caffeine (195), MRFA (524), Ultramark 1621 (max. při 1621) and n-butylamine (74). Záznam kalibrace je na obrázku (Obrázek 17).



Obrázek 17: MS záznam kalibrantu v ESI +

Dle pokynů výrobce byla provedena základní evaluace pro sledování přesnosti hmoty (mass check), evaluace izolace (ISO mass, Q trans), dle potřeby byla provedena kalibrace daných parametrů. Pro základní kalibraci stačí cca 100 l kalibrantu. Před a po provedení kalibrace se kapilára i stříkačka propláchnou MeOH. Po úspěšném dokončení kalibrace je možné začít s měřeními.

Vzorky byly vyjmuty z mrazáku, naředěny na **0,1 µg/µl** pomocí mobilní fáze load A (každá frakce obsahuje cca 2,6 g peptidů, 26 l load A bylo přidáno ke každému vzorku). Dále byl připraven CytC 100 fmol/l.

Vzorky byly analyzovány v následujícím pořadí: Blank (mobilní fáze load A), CytC, 4x vzorek, Blank (mobilní fáze load A), CytC.

Blanky byly analyzovány 35 min metodou s 10 min gradientem 6-45-2 % B, CytC byl analyzován 60 min metodou s 30 min gradientem 2-45-6 % B a vzorky 85 min metodou s 60 min gradientem 6-44 % B. Vzorky byly analyzovány při průtoku 0,200 l/min s nástřikem při 8 l/min. Při analýze CytC byl na kolonu nastříknut 1 l vzorku, u vzorků plodových vod bylo nastříknuto 5 l vzorku, tedy 0,5 g.

Vzorky byly analyzovány ve 3 technických replikátech dle následujících parametrů:

- Mobilní fáze: A-2% ACN, 0,1% FA, B-80% ACN, 0,1% FA
- Kolona: Acclaim PepMap RSLC, 75 m, 50 cm, C 18, 2 m a předkolonka PepMap 100 ViperTrap, 3 m, 100
- LC přístroj: UHPC UltiMate 3000
- MS přístroj: Q Exactive plus
- Výhřev kolony: 35 C
- Maximální tlak na koloně: 780 bar pro nanopumpu, 600 bar pro loading pumpu
- Výhřev autosampleru: 5 C
- Objem nástřiku vzorku: 5 l
- Délka metody: 35 min (metoda A – analýza blanků), 60 min (metoda B – analýza standardů CytC), 85 min (metoda C – analýza vzorků)
- Gradient: 35 min metoda - Tabulka 14, 60 min metoda - Tabulka 15 a 85 min metoda - Tabulka 16

Tabulka 14: Gradient metody pro finální LC-MS/MS analýzu blanků (35 min metoda)

čas [min]	% nano B	průtok – nano [μl/min]	průtok – loading [μl/min]
0	6	0,2	8
3	6	0,2	8
13	45	0,2	8
14	90	0,2	8
18	90	0,2	8
19	2	0,2	8
35	2	0,2	8

Tabulka 15: Gradient metody pro finální LC-MS/MS analýzu CytC (60 min metoda)

čas [min]	% nano B	průtok – nano [μl/min]	průtok – loading [μl/min]
0	2	0,2	8
3	2	0,2	8
33	45	0,2	8
34	90	0,2	8
38	90	0,2	8
39	6	0,2	8
60	6	0,2	8

Tabulka 16: Gradient metody pro finální LC-MS/MS analýzu vzorků (85 min metoda)

čas [min]	% nano B	průtok – nano [μl/min]	průtok – loading [μl/min]
0	6	0,2	8
3	6	0,2	8
63	44	0,2	8
64	90	0,2	8
68	90	0,2	8
69	6	0,2	8
85	6	0,2	8

V průběhu měření byly porovnávány standardy a následně i jednotlivé replikáty mezi sebou. Porovnání replikátů (Příloha 3), standardů (Příloha 4) a ukázka technické poruchy (Příloha 5) jsou uvedeny v přílohách.

#### full MS a MS/MS nastavení:

Parametry nastavení hmotnostního spektrometru při analýze ve skenovacím módu (full MS) a při fragmentaci prekurzorů (MS/MS) jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 17). Pro interní kalibraci spekter (Lock mass) byla použita hmota  $m/z$  445,12003 ( $[(C_2H_6SiO)_6+H]^+$ ).

Tabulka 17: Parametry nastavení hmotnostního spektrometru Q Exactive plus při LC-MS/MS

<b>full MS</b>	
<b>Rozlišení</b>	30 000
<b>Maximální počet iontů v pasti</b>	3x10 <sup>6</sup>
<b>Náboj</b>	<1, >8,
<b>Doba plnění</b>	100 ms
<b>Rozmezí m/z</b>	350–1600 m/z
<b>MS/MS</b>	
<b>Rozlišení</b>	17 500
<b>Maximální počet iontů v pasti</b>	1x10 <sup>5</sup>
<b>Doba plnění</b>	50–60 ms
<b>Normalizovaná kolizní energie</b>	33
<b>Dynamická exkluze</b>	8 s
<b>Počet prekurzorů pro fragmentaci</b>	10
<b>Izolační okno</b>	3 Da

Analýza byla provedena v režimu IDA (Information Dependent Acquisition), častěji známa jako DDA (data-dependent acquisition). Tento typ analýzy umožňuje fragmentaci všech iontů ze zvoleného *m/z* rozmezí a zvolené množství nejintenzivnějších iontů dále podrobuje MS2 analýze. Výstupní data byla po LC-MS/MS analýze zpracována pomocí programu MaxQuant 5.1.2.8 se zabudovaným vyhledávačem Andromeda. Parametry nastavení pro vyhodnocení byly zvoleny následovně: jako dynamická modifikace byla nastavena deamidace a oxidace, jako fixní modifikace vyplývající z úpravy vzorku při přípravě byla zvolena methylthiolace. Maximální MS/MS tolerance byla nastavena na 20 ppm. Minimální počet aminokyselin v peptidu byl nastaven na 5. Pro kvantifikaci nebyly brány modifikované peptidy a daný peptid musel být zachycen minimálně dvakrát. Bylo akceptováno 5 % falešně pozitivních výsledků mezi všemi spolehlivě identifikovanými peptidy (FDR 0,05).

Identifikace probíhala na základě analýzy intenzit peptidů ve vzorku. Výsledné proteiny byly identifikovány a kvantifikovány pomocí jedinečných peptidových sekvencí (unique peptides) nebo byly vytvořeny proteinové skupiny (protein groups) pomocí sdílených peptidových sekvencí (razor peptides). Ke kvantifikaci proteinů byly využity pouze nemodifikované peptidy.

### 4.3. Statistické zpracování dat, jejich identifikace a kvantifikace

Proces zpracování a vyhodnocení dat byl rozdělen do několika kroků:

- Základní statistické vyhodnocení souboru pacientek
- Vyhodnocení stanovení celkového množství proteinů ve vzorcích metodou BCA
- Vyhodnocení imunodeplece
- Identifikace proteinů na základě analýzy peptidů
- Výpočet iTRAQ poměrů
- Příprava základního datasetu
- Filtrování dat
- Imputace a normalizace dat
- Statistické zpracování finálního datasetu
- Vizualizace dat

Základní zpracování a vyhodnocení dat bylo provedeno v programu MS Office Excel a R. K identifikaci a kvantifikaci dat byl použit software Max Quant verze 1.5.2.8. Pro přesnější určení možných modifikací u vzorku byl použit volně dostupný program PMi Preview Commercial. K imputaci, normalizaci a finální vizualizaci byly použity programy Perseus verze 1.5.1.6 a program R verze 3.3.1.

## 5. Výsledky

Výsledky jsou pro přehlednost rozděleny do bloků, ve kterých byly postupně zpracovány, jak je uvedeno v kapitole 4.3.

### 5.1. základní statistické vyhodnocení souboru pacientek

Tabulka (Tabulka 18) znázorňuje statisticky zpracované údaje o souboru pacientek. Data byla zpracována v programu MS Excel, k vyhodnocení byl použit t-test.

Věk pacientek se pohyboval v době odběru mezi 27 až 43 lety. Gestační stáří plodu při odběru v rozmezí 102–119 týdnů ani počet předchozích těhotenství (0–6) není pro rozdělení do pozitivní a kontrolní skupiny statisticky významné. Věk matky při odběru plodové vody, v průměru o rok vyšší v pozitivní skupině, naopak statisticky významné je. Což se shoduje s rizikovými faktory, kterým právě vyšší věk matky je. Dalším statisticky významným rozdílem mezi skupinami je porodní váha novorozence.

Tabulka 18: Statistika souboru pacientek

	Věk matky při odběru (roky)	Gestační stáří při odběru (dny)	Počet předchozích těhotenství	Gestační stáří při porodu (dny)	Porodní váha (gramy)
<b>Celý soubor pacientek</b>					
<b>Minimální hodnota</b>	27	102	0	219	1415
<b>Maximální hodnota</b>	43	119	6	293	4730
<b>Střední hodnota</b>	36,63	110,3	1,172	267,2	3197
<b>Směrodatná odchylka</b>	3,047	4,296	1,189	19,42	633,6
<b>Pozitivní skupina (case)</b>					
<b>Minimální hodnota</b>	33	102	0	219	1415
<b>Maximální hodnota</b>	43	119	6	258	3410
<b>Střední hodnota</b>	37,67	110	1,292	245,6	2603
<b>Směrodatná odchylka</b>	3,002	5,12	1,517	12,88	441,9
<b>Kontrolní skupina (control)</b>					
<b>Minimální hodnota</b>	27	105	0	269	2875
<b>Maximální hodnota</b>	43	118	4	293	4730
<b>Střední hodnota</b>	36	110,4	1,1	280,1	3554
<b>Směrodatná odchylka</b>	2,935	3,781	0,9554	7,318	430,7
<b>P hodnota t test (case vs. control)</b>	<b>0,033</b>	<b>0,7495</b>	0,5368	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>statisticky významné (p &lt; 0,05)</b>	<b>ano</b>	ne	ne	<b>ano</b>	<b>ano</b>

## 5.2. vyhodnocení stanovení celkového množství proteinů ve vzorkách metodou

### BCA

Pro přehled je vyhodnocení ukázáno pouze na 4 testovacích vzorkách SA, SB, SC a SD. Podle stejného principu bylo vyhodnoceno všech 64 vzorků plodových vod. Vyhodnocení bylo provedeno v programu přístroje Beckman Reader a dále zpracováno v MS Excel. Umístění vzorků v 96 jamkové destičce při měření je zobrazeno v tabulce (Tabulka 19), ukázka vyhodnocení je pak znázorněna v tabulce (Tabulka 20).

Tabulka 19: Rozmístění vzorků a standardů v 96 jamkové destičce

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	SA	SA								
B	ST1	ST1	SB	SB								
C	ST2	ST2	SC	SC								
D	ST3	ST3	SD	SD								
E	ST4	ST4										
F	ST5	ST5										
G												
H												

Tabulka 20: Ukázka výsledků získaných z BCA analýzy testovacích vzorků

Jamka	Vzorek	absorbance (OD)	absorbance (OD) (průměr)	absorbance (OD) (CV)	absorbance (OD) (SD)	koncentrace [µg/ml]
A1	Blank					
A2	Blank					
A3	SA	0,374	0,37	1.529%	0,006	7107,632
A4	SA	0,366	0,37	1.529%	0,006	7107,632
B1	ST1	0,114	0,113	1.252%	0,001	2078,278
B2	ST1	0,112	0,113	1.252%	0,001	2078,278
B3	SB	0,228	0,226	1.568%	0,004	4289,628
B4	SB	0,223	0,226	1.568%	0,004	4289,628
C1	ST2	0,212	0,212	0.334%	0,001	4015,656
C2	ST2	0,211	0,212	0.334%	0,001	4015,656
C3	SC	0,24	0,241	0.587%	0,001	4583,17
C4	SC	0,242	0,241	0.587%	0,001	4583,17
D1	ST3	0,316	0,314	1.128%	0,004	6011,742
D2	ST3	0,311	0,314	1.128%	0,004	6011,742
D3	SD	0,516	0,481	10.291%	0,049	9279,843
D4	SD	0,446	0,481	10.291%	0,049	9279,843
E1	ST4	0,401	0,396	1.605%	0,006	7616,438
E2	ST4	0,392	0,396	1.605%	0,006	7616,438
F1	ST5	0,527	0,532	1.197%	0,006	10277,886
F2	ST5	0,536	0,532	1.197%	0,006	10277,886
<b>ColorCode</b>	AnaylsisStatus					
	OK					
	Overflow					
	Error					
	Underflow					
	Unused					
	Extrapolated					
	NotEvaluated					
	Rejected					



Stejný postup vyhodnocení byl použit i pro vzorky plodových vod. Touto analýzou byly získány výsledné celkové koncentrace proteinů v každém vzorku, výsledky byly přepočítány na mg/ml jak je uvedeno v tabulce (Tabulka 21).

Tabulka 21: Přehled koncentrací celkového proteinu vzorků plodových vod v mg/ml

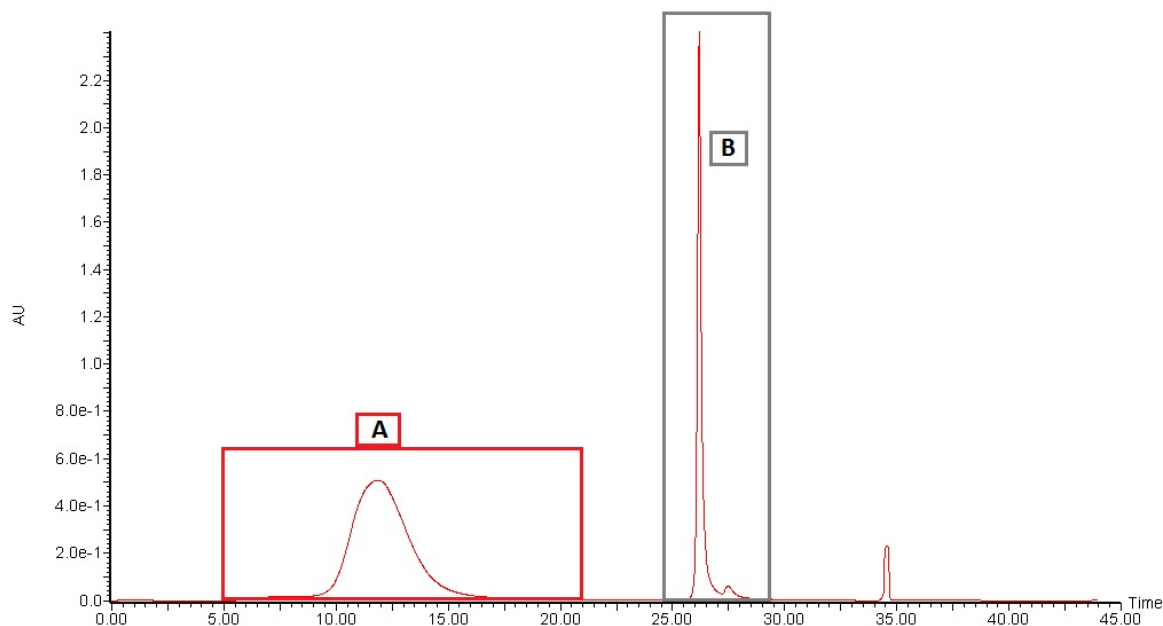
<b>BCA</b>		
<b>Číslo vzorku</b>	<b>Case/control (1/0)</b>	<b>BCA [mg/ml]</b>
1	1	4,32
2	0	4,51
36	0	4,04
52	0	3,65
64	1	4,48
78	0	3,65
95	0	4,28
136	0	2,43
150	0	3,45
187	0	2,63
193	0	3,20
203	0	3,33
220	0	3,63
229	1	3,34
238	0	2,70
260	0	3,44
276	1	4,23
283	0	4,96
309	0	5,72
340	0	5,00
366	0	2,90
403	0	6,81
407	0	6,08
415	0	3,93
417	1	3,91
418	1	3,37
422	1	4,13
439	0	4,44
456	1	5,14
459	0	4,06
485	0	4,39
503	0	3,82
506	1	6,79
533	0	6,22
540	0	3,56
562	1	3,42
565	0	3,77
572	1	3,17
588	0	3,93
604	0	3,72
618	0	4,01
636	0	4,97
657	0	4,04

<i>BCA</i>		
<b>Číslo vzorku</b>	<b>Case/control (1/0)</b>	<b><i>BCA [mg/ml]</i></b>
673	1	4,69
682	0	5,70
687	1	4,39
695	1	2,87
696	0	4,18
714	1	4,73
744	0	3,13
746	1	8,85
753	0	3,94
766	0	3,97
795	0	5,21
839	0	4,03
840	0	5,31
892	1	3,63
940	1	2,56
980	1	3,28
988	1	3,85
1029	1	4,21
1097	1	5,71
1112	1	2,94

### **5.3. vyhodnocení imunodeplece**

Pomocí imunoafinitní chromatografie byly vzorky depletovány od vysoce abundantních proteinů. K analýze bylo použito 400 g proteinů. Přibližně 90 % všech proteinů jsou právě proteiny vysoce abundantní a byly ze vzorků odstraněny. Imunodeplecí byl získán soubor vzorků, kde každý vzorek obsahoval přibližně 40 g celkového proteinu.

Záznam chromatogramu je uveden na obrázku (Obrázek 18).



Obrázek 18: UV/VIS chromatografický záznam imunodeplece: frakce A obsahuje proteiny nenavázané na protilátky kolony – nízko a středně zastoupené, tato frakce byla jímána; frakce B obsahující abundantní proteiny navázané na kolonu

#### 5.4. identifikace proteinů na základě analýzy peptidů po LC-MS/MS analýze

Všechny výsledky proteomické LC-MS/MS analýzy byly zpracovány pomocí programu MaxQuant. Všech dvacet multiplexů bylo vyhodnoceno samostatně a výsledky pak hromadně dále zpracovány. Průměrně bylo na každý multiplex (tedy 3 vzorky a jeden GIS) zpracováno 231993 MS/MS spekter z čehož bylo identifikováno 2100 proteinových skupin. Podrobnější počty identifikací popisuje tabulka (Tabulka 22). Jak již bylo zmíněno výše, výsledné proteiny jsou uvedeny jako proteinové skupiny, tedy skupina proteinů, kdy nebylo kvůli sdílené peptidové sekvenci jednoznačně rozlišitelné, o jaký protein se jedná.

Tabulka 22: Průměrné počty identifikací na jeden multiplex po LC-MS/MS analýze

Identifikace	Anglický název	Průměr na multiplex	CV (%)
<b>zpracovaná MS/MS spektra</b>	Search inputs (MS/MS submitted)	231 993	4
<b>identifikovaná MS/MS spektra</b>	PSM(s) (MS/MS identified)	43 854	16
<b>modifikované peptidové sekvence</b>	modified peptide sequence	14 258	<b>15</b>
<b>jedinečné peptidové sekvence</b>	unique peptide sequence	10 945	<b>14</b>
<b>proteinové skupiny</b>	protein groups	2 100	<b>9</b>

## 5.5. výpočet iTRAQ poměrů

Dále bylo potřeba data upravit z hodnot intenzit na hodnoty poměrů. Díky využití technologie iTRAQ byla data zaznamenána jako intenzity reporterových iontů. Tyto hodnoty je nutné vztáhnout vždy k poměrů ku globálnímu internímu standardu. V každém multiplexu, tedy souboru 3 vzorků a jednoho GIS, který byl měřen v jednom nástřiku, jako jediný vzorek, bylo nutné tyto poměry vyčíslit. Výsledná hodnota tedy nebyla přímá odezva daného proteinu, ale jeho poměr v rámci celého souboru ke GIS. Tyto poměry byly vytvořeny v programu Excel. Schéma tohoto zpracování je na následujícím schématu (Obrázek 19).

	Vzorek	µg	iTRAQ značka
Multiplex 1	GIS	9	114
	1	9	115
	2	9	116
	36	9	117

ID proteinu	Intensita reporterového iontu 114	Intensita reporterového iontu 115	Intensita reporterového iontu 116	Intensita reporterového iontu 117
protein XY	32072	28742	37473	46282
protein AB	245760	303990	269600	467630
protein QR	155020	143430	240640	372660

→ Výpočet poměru intenzit vzorku ku GIS:

115/114, 116/114, 117/114

ID proteinu	Poměr vzorku ku GIS Pacient 1	Poměr vzorku ku GIS Pacient 2	Poměr vzorku ku GIS Pacient 3
protein XY	0.896171115	1.168402345	1.443065602
protein AB	1.236938477	1.097005208	1.902791341
protein ZZ	0.925235453	1.55231583	2.403947878

Obrázek 19: Schéma výpočtu iTRAQ poměrů z intenzit reporterových iontů

## 5.6. příprava základního datasetu

Po vytvoření poměrů byl vytvořen základní soubor dat, ze kterého byly vyfiltrovány proteiny identifikované na základě reverzní databáze a kontaminanty. Na základě této úpravy vznikl soubor dat, který byl tvořen celkem 3185 proteinovými skupinami. Tyto proteinové skupiny byly identifikovány napříč všemi multiplexy ve všech třech technických replikátech.

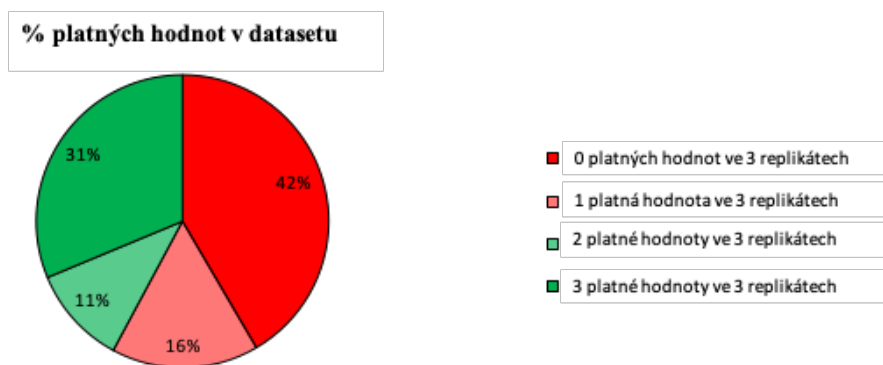
## 5.7. filtrování dat

Data byla následně filtrována. Filtrování bylo provedeno na úrovni proteinů v rámci celého datasetu. Pokud daný protein splňoval níže uvedená kritéria, byl nadále v datasetu zachován.

Celkem byly vytvořeny 3 podmínky pro filtraci dat:

1. Minimální počet 2 platných hodnot ze tří replikátů

Touto úpravou bylo odstraněno celkem 58 % proteinů (42 % dat nemělo žádnou platnou hodnotu, 16 % pouze jednu ze tří replikátů), jak je vidět na obrázku (Obrázek 20). Příklad přijetí proteinu do dalšího zpracování je uveden tabulce (Tabulka 23).



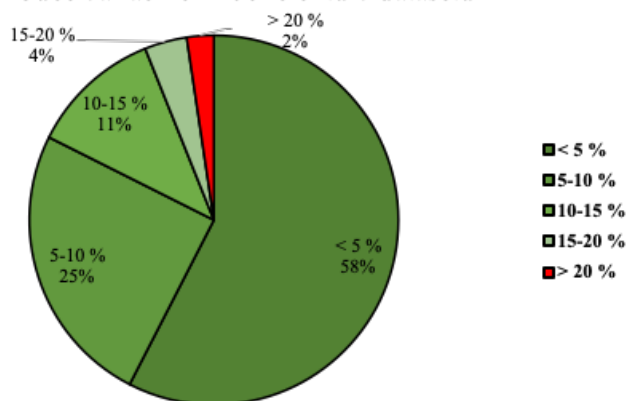
Obrázek 20: Procenta platných hodnot napříč triplikáty

Tabulka 23: Podmínky přijetí či zamítnutí proteinu pro další zpracování na základě platných hodnot u příkladového proteinu XY

	Pacient 1			Pacient 2			Pacient 3			Pacient 4			Pacient 5		
	repl 1	repl 2	repl 3	repl 1	repl2	repl 3	repl 1	repl 2	repl 3	repl 1	repl2	repl 3	repl 1	repl 2	repl 3
ProteinXY	0.6673	0.5833	0.5976	1.5673	N/A	1.4447	0.6716	0.7167	1.2500	0.8485	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Přijato/ zamítnuto	Přijato			Přijato			Přijato			zamítnuto			zamítnuto		

2. Variační koeficient menší než 20 % mezi jednotlivými replikáty

Distribuce variačních koeficientů v datasetu



Obrázek 21: Zobrazení variačního koeficientu mezi triplikáty

Jak je vidět z grafu (Obrázek 21), měření v rámci replikátů bylo velice reprodukovatelné. Pouze 2 % dat bylo zamítnuto z důvodu vyššího variačního koeficientu než 20 %. Podmínky pro přijetí proteinu pro další zpracování jsou vyobrazeny v tabulce (Tabulka 24) na příkladovém proteinu XY.

Tabulka 24: Podmínky přijetí či zamítnutí proteinu pro další zpracování na základě variačního koeficientu u příkladového proteinu XY

	Pacient 1			Pacient 2			Pacient 3			Pacient 4			Pacient 5		
	repl 1	repl 2	repl 3	repl 1	repl2	repl 3	repl 1	repl 2	repl 3	repl 1	repl2	repl3	repl1	repl2	repl3
Protein XY	0.6673	0.5833	0.5976	1.5673	N/A	1.4447	0.6716	0.7167	1.2500	0.8485	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CV	5.95%			4.07%			29.87%			N/A			N/A		
Přijato/ zamítnuto	Přijato			Přijato			zamítnuto			zamítnuto			zamítnuto		

3. Splnění obou předchozích podmínek alespoň v 75 % mezi kontrolní skupinou pacientek a skupinou s předčasným porodem.

Podmínky pro přijetí proteinu pro další zpracování jsou vyobrazeny v tabulce (Tabulka 25) na příkladových proteinech XY, AB a ZZ.

Tabulka 25: Finální přijetí či zamítnutí proteinu na základě splnění obou předchozích podmínek v alespoň 75 % obou skupin

	case				Kontrolní skupina				Finální data
	Pacient 1	Pacient 2	Pacient 3	Pacient 4	Pacient 5	Pacient 6	Pacient 7	Pacient 8	
Protein XY			75%					100%	Přijato
Protein AB				100%		50%			Zamítnuto
Protein ZZ	25%							50%	Zamítnuto

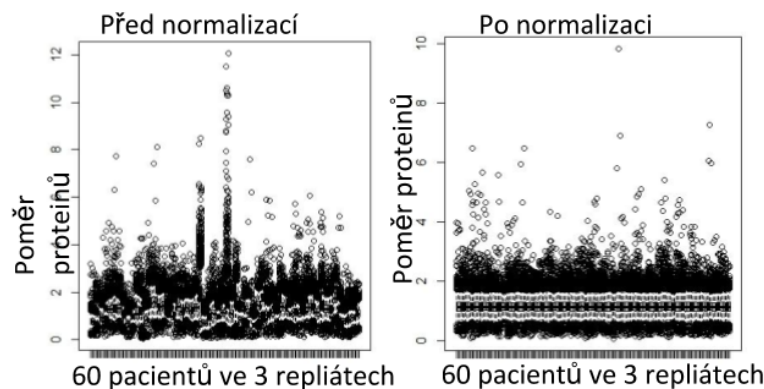
## 5.8. imputace a normalizace dat

Na základě těchto kritérií byl z původního souboru 3185 identifikovaných proteinů vytvořen soubor 1111 kvantifikovaných proteinových skupin.

Dalším krokem byla imputace dat. Dle předchozích podmínek byly v souboru dat i proteiny, u kterých byly nulové hodnoty. Pro následnou normalizaci dat bylo potřeba tyto nulové hodnoty doplnit. Z celého souboru bylo potřeba nahradit 8 % dat. Pokud v hodnotách ze tří replikátů chyběla jedna, byla nahrazena průměrem dvou předchozích. Pokud chyběly dvě doplnila se hodnota jedné zbývající a pokud chyběly všechny tři, byly nahrazeny mediánem z dané skupiny (kontrolní/ s předčasným porodem) (Tabulka 26). Dále byla v programu R provedena LOESS normalizace dat. Tato normalizace snižuje rozdíly mezi technickými replikáty uvnitř skupin, což vzhledem k tomu, že jsou všechny data vztažena k jednomu vnitřnímu standardu, je žádoucí. Porovnání dat před a po normalizaci zobrazuje obrázek (Obrázek 22).

Tabulka 26: Typy imputovaných dat dle parametru měření replikátů na příkladu 4 pacientů

Přijaté proteiny	Pacient 1			Pacient 2			Pacient 3			Pacient 4		
	repl 1	repl 2	repl 3	repl 1	repl 2	repl 3	repl 1	repl 2	repl 3	repl 1	repl 2	repl 3
<b>Protein XY</b>	0,667	0,583	0,597	1,567	N/A	1,444	0,848	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
<b>Imputace</b>	ne			průměr 2 hodnot			kopie hodnoty			medián skupiny		



Obrázek 22: Zobrazení dat před a po normalizaci pomocí LOESS normalizace v programu R

### 5.9. statistické zpracování finálního datasetu

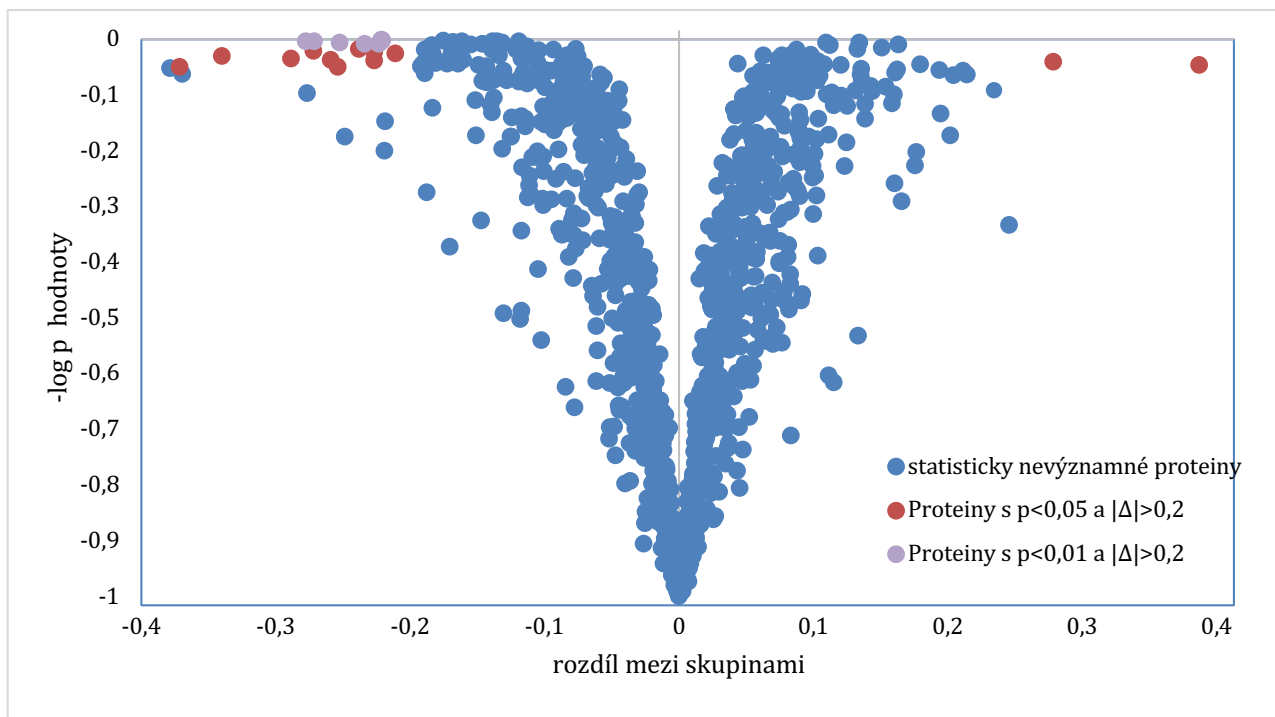
Po normalizaci byla data statisticky zpracována pomocí t-testu. Replikáty byly vyhodnoceny jako závislá data, byly tedy použity průměry z replikátů. Chybějící hodnoty byly nahrazeny průměry a mediány z dat před normalizací a imputací, aby nedošlo ke zkreslení hodnot. Pokud chyběly všechny replikáty, byly hodnoty brány jako chybějící.

### 5.10. vizualizace dat

Výsledky byly statisticky zpracovány dle  $p$  hodnoty jednoduchého t-testu a absolutního rozdílu mezi skupinami. Takto získaná data byla dále vizuálně zpracována ve formě grafu. Hladiny kritérií byly stanoveny na úrovni  $p$  hodnoty t-testu pod 0,05 a absolutního rozdílu mezi skupinami nad 0,2.

Tato kritéria splňovalo celkem 18 proteinů (červeně a fialově označené v grafu (Obrázek 23), přičemž 6 z nich mělo  $p$  hodnotu pod 0,01, jak je tučně vyznačeno v tabulce a fialově v grafu, která data souhrnně zobrazuje (Tabulka 27).



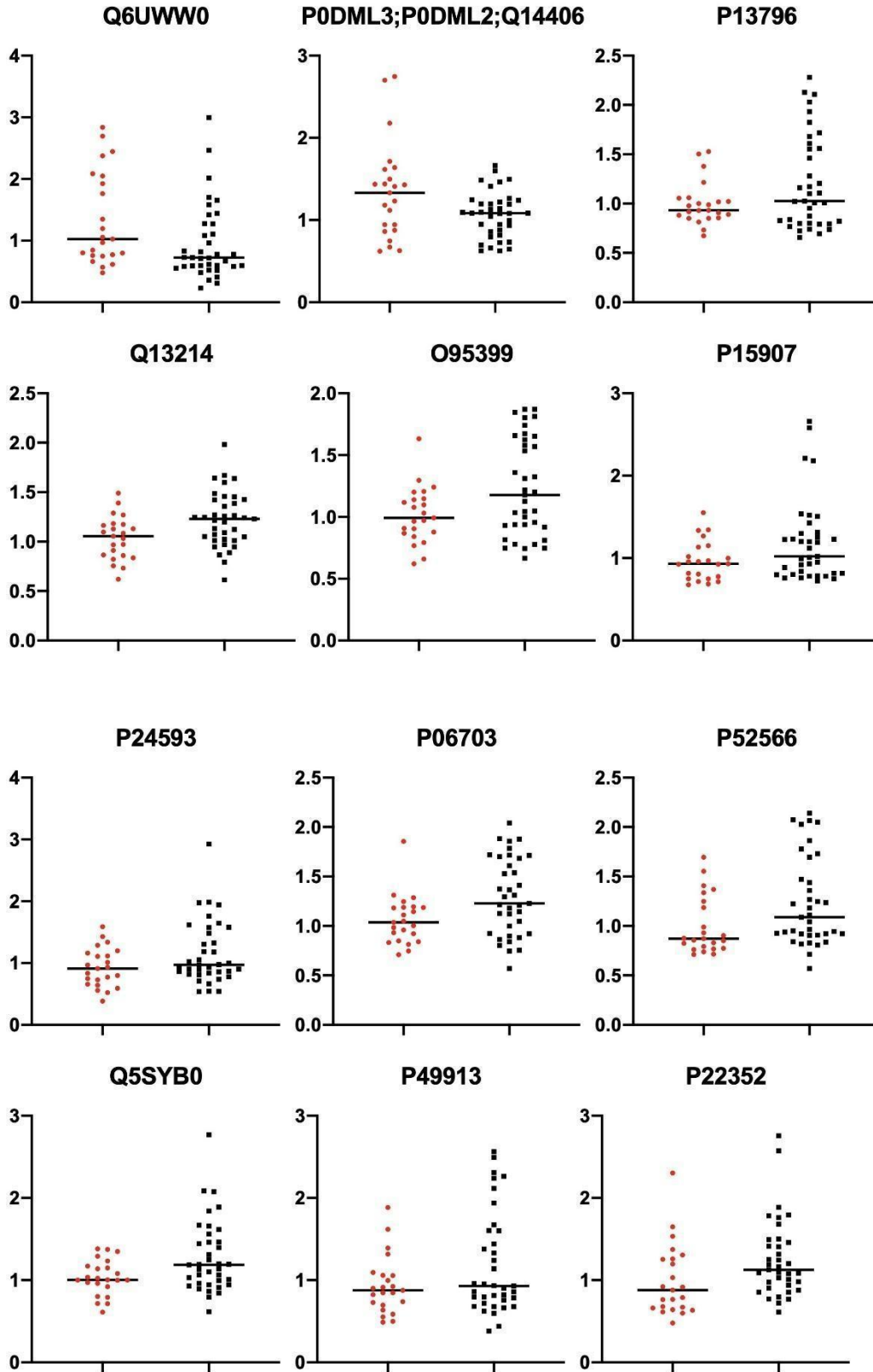


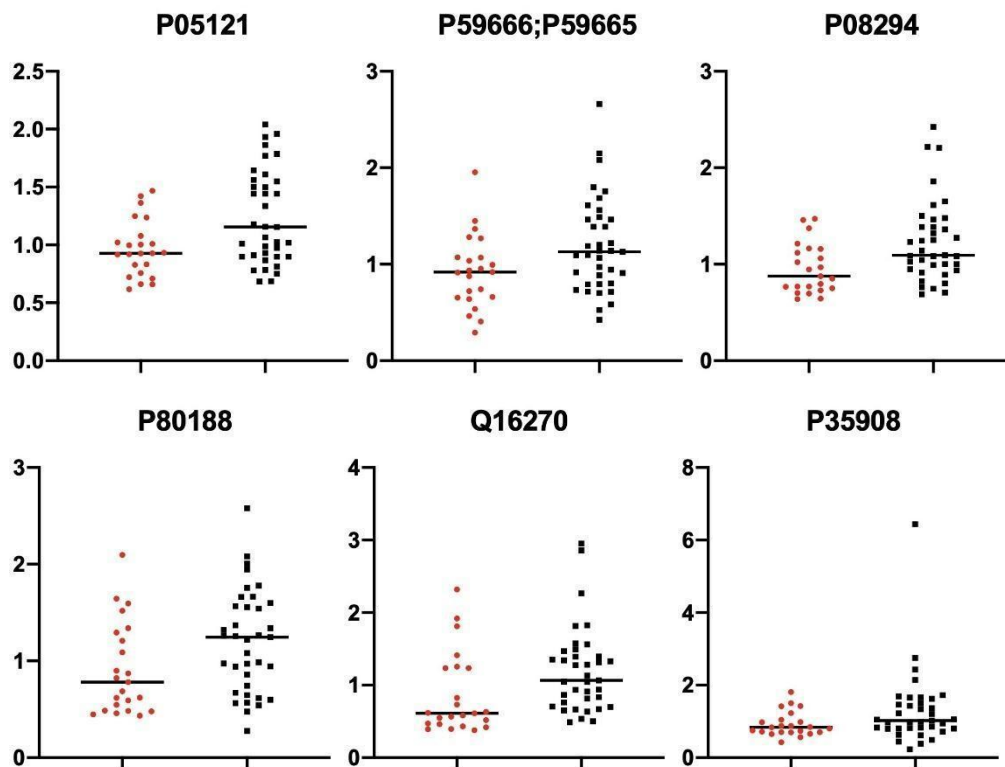
Obrázek 23: Zpracování všech kvantifikovaných proteinů formou volcano grafu

Tabulka 27: Výsledky zpracování statisticky významných dat z proteomické studie

Název proteinu	ID proteinové skupiny (proteiny se sdílenými peptidy)	p-hodnota	meziskupinový rozdíl	dysregulace
Lipocalin-15	Q6UWW0	0,04417	0,38700	up
Chorionic somatomammotropin hormone 2	P0DML3;P0DML2;Q14406	0,03932	0,27849	up
Plastin-2	P13796	0,02396	-0,21126	down
Semaphorin-3B	Q13214	<b>0,00099</b>	-0,22140	down
Urotensin-2	O95399	<b>0,00716</b>	-0,22344	down
Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	P15907	0,02137	-0,22675	down
Insulin-like growth factor-binding protein 5	P24593	0,03701	-0,22694	down
Protein S100-A6	P06703	<b>0,00620</b>	-0,23385	down
Rho GDP-dissociation inhibitor 2	P52566	0,01597	-0,23855	down
FERM and PDZ domain-containing protein 1	Q5SYB0	<b>0,00440</b>	-0,25244	down
Cathelicidin antimicrobial peptide	P49913	0,04774	-0,25402	down
Glutathione peroxidase 3	P22352	0,03509	-0,25909	down
Plasminogen activator inhibitor 1	P05121	<b>0,00192</b>	-0,27168	down
Neutrophil defensin 3	P59666;P59665	0,01900	-0,27238	down
Extracellular superoxide dismutase {{Cu-Zn}}	P08294	<b>0,00227</b>	-0,27784	down
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	P80188	0,03269	-0,28865	down
Insulin-like growth factor-binding protein 7	Q16270	0,02842	-0,34045	down
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908	0,04849	-0,37175	down

Jednotlivé statisticky významné proteiny dále znázorňují následující grafy (Obrázek 24), které vždy porovnávají daný protein (v názvu grafu) a jeho relativní hodnoty na základě p hodnot a meziskupinového rozdílu ve skupině pozitivních (červeně) a kontrolních (černě) vzorkách.





Obrázek 24: Grafické znázornění statisticky významných proteinů. Relativní hladiny proteinů ve vztahu k GIS – Osa X označuje relativní hladinu proteinu, osa Y označuje červeně pozitivní, skupina case, tedy s předčasným porodem a černě kontrolní skupinu daného proteinu (proteinové skupiny) z názvu daného grafu. Vodorovné úsečky označují medián.

Na základě těchto dat byla dále spolupracující skupinou ve vědku proveden a validační a replikační fáze studie, jež ovšem nebyly součástí této práce. Výsledky validační a replikační části jsou komentovány v diskuzi.

## 6. Diskuze

Cílem této práce bylo zjistit, zda je možné pomocí LC-MS/MS proteomických metod identifikovat biomarkery předčasného porodu z plodové vody odebrané v období mezi 14. - 17. týdnem těhotenství, které by bylo možné využít k predikci předčasného porodu v klinické praxi a tím snížit jeho incidenci.

Plodová voda nabízí široký potenciál ke studiu rozsáhlé škály těhotenských komplikací. Pro přípravu vzorku k analýze byl zvolen postup, který se pro shotgun proteomiku běžně využívá – tedy úprava vzorku, enzymatické štěpení a následná separace směsi peptidů pomocí chromatografické separace se spektrometrickou detekcí [73].

Překážkou analýzy plodové vody je ovšem její vysoká komplexita a velké koncentrační rozdíly v zastoupení jednotlivých proteinů dosahující až 12 koncentračních řádů. Více než 90 % celkového proteinového obsahu těchto vzorků však tvoří několik málo vysoce zastoupených proteinů, především albumin, imunoglobulin G a další, které mohou zastiňovat diagnosticky často zajímavé a nízko koncentrované proteiny, které mohou být slibnými kandidáty pro výzkum biomarkerů rozličných klinických stavů [30].

Proto byly v této studii využity takzvané multidimenzionální (MudPIT – Multidimensional Protein Identification Technology) přístupy vedoucí ke zvýšení efektivity pokrytí analyzovaného proteomu analyzovaného biologického vzorku, tedy rozličné technologické postupy přispívající ke snížení komplexity vzorků a maximalizaci počtu identifikací. Kromě tedy již výše zmíněného standardního postupu bylo využito imunodeplece, kombinace dvou enzymů, izobarického značení vzorků a dvourozměrné chromatografie zakončené tandemovou hmotnostní analýzou. Jednotlivé kroky jsou dále popsány.

Imunodeplece byla provedena pomocí kolony MARS Hu-14 s protilátkami proti nejvíce zastoupeným proteinům. Tato metoda byla vyvinuta pro snížení komplexity lidské plasmy a je zaměřená na odstranění 14 nejvíce zastoupených proteinů (albumin, IgG, antitrypsin, IgA, transferin, haptoglobin, fibrinogen, 2 -makroglobulin, 1 -kyselý glykoprotein, IgM, apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II, komplement C3 a transthyretin). Vzhledem k tomu, že podobně jako ostatní tělní tekutiny vzniká i plodová voda primárně z plazmy, sdílí s ní i spektrum nejvíce zastoupených proteinů. Nicméně s postupující délkou těhotenství se plodová voda svým

složením od krevní plazmy vzdaluje. Přes placentu do plodové vody neprocházejí velké molekuly, neobsahuje tedy např. imunoglobulin M, který je v plazmě hojně zastoupený. Dále na rozdíl od krevní plazmy obsahuje velké množství fibronektinu místo fibrinogenu a neobsahuje haptoglobin ve významné koncentraci [74]. Při použití MARS kolony navržené pro depleci krevní plazmy nedosahuje pak frakcionace takové účinnosti, jak je vidět v tabulce (Tabulka 28), ale i přesto dochází k odstranění přibližně 90 % celkového proteomu ve formě abundantní proteinů.

Tabulka 28: Seznam proteinů depletovaných pomocí MARS Hu-14 kolony a porovnání nejvíce zastoupených proteinů krevní plazmy a plodové vody. Zvýrazněné proteiny plodové vody jsou odstraněny pomocí této kolony [74]

Proteiny odstraněné pomocí MARS Hu-14 kolony	15 nejvíce zastoupených proteinů krevní plazmy	15 nejvíce zastoupených proteinů plodové vody
<b>albumin</b>	albumin	<b>albumin</b>
<b>IgG</b>	imunoglobuliny {{IgG,IgA,IgM}}	imunoglobuliny {{ <b>IgG,IgA</b> }}
<b>antitrypsin</b>	serotransferrin	fibronektin
<b>IgA</b>	fibrinogen	<b>serotransferrin</b>
<b>transferin</b>	-mikroglobulin	<b>komplement C3</b>
<b>haptoglobin</b>	$\alpha_1$ -antitrypsin	<b><math>\alpha_1</math>-antitrypsin</b>
<b>fibrinogen</b>	komplement C3	ceruloplasmin
<b><math>\alpha_2</math>-makroglobulin</b>	haptoglobin	-fetoprotein
<b><math>\alpha_1</math>-kyselý glykoprotein</b>	apolipoprotein A-I	vitamin D-vážíci protein
<b>IgM</b>	apolipoprotein B	periostin
<b>apolipoprotein A-I</b>	$\alpha_1$ -kyselý glykoprotein	<b>apolipoprotein A-I</b>
<b>apolipoprotein A-II</b>	lipoprotein	antithrombin III
<b>komplement C3</b>	faktor H	prekurzor transformačního růstového faktoru indukovaný proteinem Ig-H3
<b>transthyretin</b>	ceruloplasmin	-mikroglobulin
	komplement C4	plasminogen

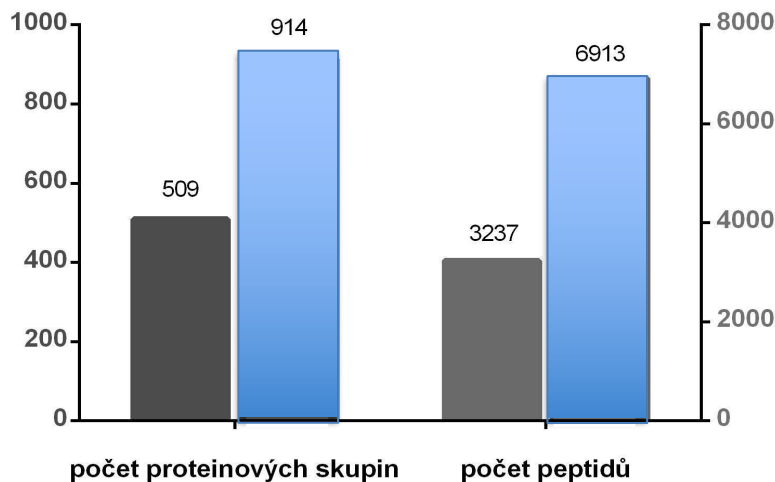
V kolonách jsou na nosiči imobilizovány protilátky proti požadovaným abundantním proteinům. Biologický vzorek je na kolonu aplikován v nanášecím pufru, který minimalizuje protein – proteinové interakce, čímž dovoluje nízkou zastoupeným proteinům, které často využívají velké proteiny jako transportní, uvolnit se z této vazby a volně projít kolonou. Vysoce zastoupené proteiny, které najdou vazebného partnera v podobě protilátky se pak na koloně zachytí. Během promytí vzorku nanášecím pufrům byla jímána frakce všech nezachycených proteinů. Poté byl systém převeden do elučního pufru, který rozrušil vazbu mezi imobilizovanou protilátkou a proteiny, což vedlo k vyplavení vysoce zastoupených proteinů v další frakci [31]. Takto upravený vzorek byl pak podroben další analýze.

Kromě nesporných výhod s sebou však imunodeplece přináší i určitá rizika. Pravděpodobněji nejvýznamnějším je nechtěné odstranění proteinů kvůli nespecifickým vazbám na nosič kolony či

možnosti navázání potenciálně zajímavých proteinů na vysoce zastoupené proteiny. Některé práce provedené na krevní plazmě také poukazují na neúplnou depleci požadovaných abundantních proteinů [75, 76] či naopak na nechtěné zadržení proteinů jako je 1 -kyselý glykoprotein 1, 1 -kyselý glykoprotein 2 a 1 -antichymotrypsin na MARS koloně [77]. I navzdory tomuto riziku je imunodeplece vysoce zastoupených proteinů velmi přínosným či dokonce nutným krokem při přípravě vzorku pro proteomickou analýzu zaměřenou na identifikaci nových biomarkerů, protože její výhody značně převažují možná rizika [77, 78].

I když je výše zmíněná metoda primárně určena a také nejčastěji využívány ke zpracování lidské plazmy, v principu nic nebrání jejich aplikaci také na jiné biologické tekutiny, jak dokazuje tato či jiné studie, kde byla MARS kolona použita k depleci abundantních proteinů v lidské moči [79], cerebrospinální tekutině [80] a dalších tělních tekutinách [81].

Tento přístup byl využit v mnoha projektech analyzujících plodovou vodu pomocí LC-MS/MS. Díky němu bylo možné identifikovat mnoho potenciálních biomarkerů předčasného porodu spojeného s předčasnou rupturou plodových obalů (např. cathelicidin, myeloperoxidáza, matrix metaloproteináza-9, neutrofil defensin-1) [82, 83], či se spontánním předčasným porodem vyvolaným infekcí (lipocalin-1, glykodelin nebo nikotinamid fosforibosyltransferáza) [84]. Tyto a další naše studie potvrzují efektivitu MARS deplece, a především poukazují na možnost až dvojnásobného množství identifikací, právě díky odstranění vysoce zastoupených proteinů z biologického vzorku. Obrázek (Obrázek 25) znázorňuje zmíněný rozdíl v počtu identifikací na úrovni proteinů i peptidů. Tato data pochází z optimalizační fáze této studie.



Obrázek 25: Porovnání počtu identifikací vzorků před a po imunodepleci. Modře jsou znázorněné počty identifikací po imunodepleci. LC-MS/MS analýza byla provedena na vzorku poolu plodových vod v rámci přípravy protokolu pro finální projekt

Dalším krokem v přípravě vzorků pro analýzu bylo enzymatické štěpení. V této práci byla použita kombinace dvou enzymů, a to trypsinu a rekombinantní lyzinázy C.

Enzymatické štěpení pomocí trypsinu je považováno za zlatý standard shotgun proteomiky, především proto, že je velice efektivní, velmi rozšířený a cenově dostupný. Tato serinová proteáza specificky štěpí karboxylové (C-konce) konce za lysinem a argininem, čímž díky jejich častému výskytu poskytuje krátké peptidové sekvence (0,5 - 3 kDa) vhodné pro LC-MS či LC-MS/MS analýzu. Výskyt krátkých sekvencí (pod 6 aminokyselin) je ovšem také jednou z nevýhod použití trypsinu, takto krátké sekvence jsou často neidentifikovatelné a snižují tak celkové pokrytí identifikovaných částí proteomu, čímž znemožňují třeba rozlišení jednotlivých izoform proteinů či posttranslačních modifikací [73].

Další nevýhodou je pak neúplná proteolýza, špatné štěpení u k sobě těsně složených proteinů nebo neschopnost štěpit argininové a lyzinové konce sousedící s prolinem [85].

Vhodným krokem pro zvýšení efektivity štěpení a výsledného pokrytí identifikovaných částí analyzovaného proteomu je využití kombinace enzymů. Rekombinantní lyzináza C štěpí velice specificky karboxylové konce lyzinu, čímž výrazně zvyšuje efektivitu trypsinového štěpení. Je také stabilní i v denaturačních činidlech, čehož se využívá u štěpení proteolyticky stabilních proteinů [86].



V této práci byla nejprve využita vysoká specifita štěpení rLysC, po naštěpení lyzinových konců přišel na řadu trypsin, který již kratší peptidy s vysokou specifitou naštěpil na místech s lyzinem (pokud ještě nějaká zbyla) a argininem. Tento postup velice zvýšil celou efektivitu, jak bylo ukázáno na kontrole kvality štěpení v sekci výsledky.

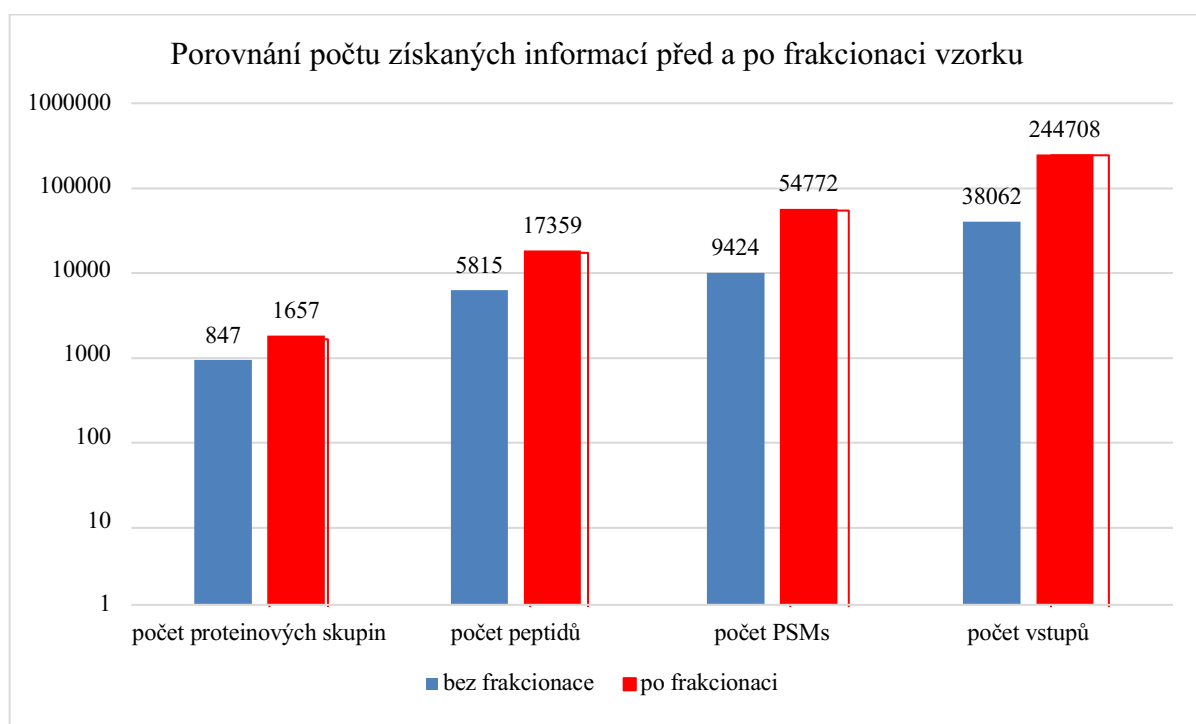
Jako další krok v přípravě vzorků pro analýzu bylo použito izobarického značení pro relativní kvantifikaci proteinů. V této studii bylo použito značení pomocí iTRAQ 4-plex. Ačkoliv jsou na trhu i další produkty jako je iTRAQ 8-plex či konkurenční značky TMT duplex, 6-plex a 10-plex, díky němuž lze analyzovat až 10 vzorků najednou, některé studie naznačují, že počty identifikovaných proteinů a peptidů jsou u využití iTRAQ 4-plex nejvyšší [57, 59]. Kvantifikace pomocí izobarických značek je v proteomických studiích velice běžná. Možnost multiplexování jednak urychluje analýzu díky měření více vzorků najednou ale také snižuje chyby vnesené do přípravy vzorků a dále chybějící hodnoty při měření. Multiplexování vzorků je proto vhodné provést co nejdříve.

Využití iTRAQ 4-plexu s sebou přináší mnoho výhod, ale i nevýhod. V porovnání jinými izobarickými značkami (iTRAQ 8-plex, TMT 10-plex) lze sice kombinovat pouze 4 vzorky, je tedy potřeba více přístrojového času a jednotlivé sady vzorku se od sebe mohou více lišit, vzniká více chybějících dat, ale nedochází, jak ukazují studie, k výraznějšímu zhoršení kvality spekter, jak tomu může být u jiných značek [57, 59]. Všeobecnou nevýhodou využití všech typů izobarických značek je jejich vysoká cena a časově náročnější příprava vzorků. Je také nutné mít dostatečně citlivou instrumentaci a dbát na přesnou přípravu vzorku [60].

Výhodu má iTRAQ-4plex, jak již bylo zmíněno, především v možnosti multiplexování 4 vzorků v jednom LC-MS/MS měření, což vede ke zkrácení celkové doby analýzy a snižuje se chyba vnesená porovnáváním více měření [57]. Další výhodou je jednoduché provádění replikátů a snížení množství chybějících hodnot, což je velice žádoucí u studií porovnávající relativní zastoupení proteinů mezi skupinami, jak je tomu v této studii [40].

Dvourozměrná chromatografie (2D-LC) se v proteomice často využívá ke snížení komplexity vzorků před vlastní tandemovou hmotnostní spektrometrií. Atraktivita této metody spočívá ve využití dvou ortogonálních LC metod a což vede ke zvýšení separační efektivity kombinací píkové kapacity obou metod. Tyto metody lze v závislosti na kombinovatelnosti

mobilních fází provádět v režimu off-line i on-line. Pro 2D-LC je možné kombinovat řadu metod jako je RP, SCX, SEC, HILIC. Vhodné kombinace s dostatečnou ortogonalitou jsou SCX-RP, HILIC-RP či RP-RP. Využití separace na reverzních fázích v obou dimenzích (RP-RP), kde se jednotlivé separace liší v pH, vykazuje nejvyšší píkovou kapacitu [87]. Tato metoda byla využita v této práci. Jak již bylo popsáno v postupu, první stupeň byl proveden v bazickém pH (pH 10), jímáné frakce byly následně kombinovány metodou nejvzdálenějšího souseda a připraveny pro následnou RP-LC-MS/MS analýzu, která probíhala v alkalickém pH. V tomto případě se tedy jednalo o off-line frakcionaci. Jak je ukázáno v grafu (Obrázek 26) níže, díky tomuto přístupu se nám povedlo získat několikanásobné množství identifikací.

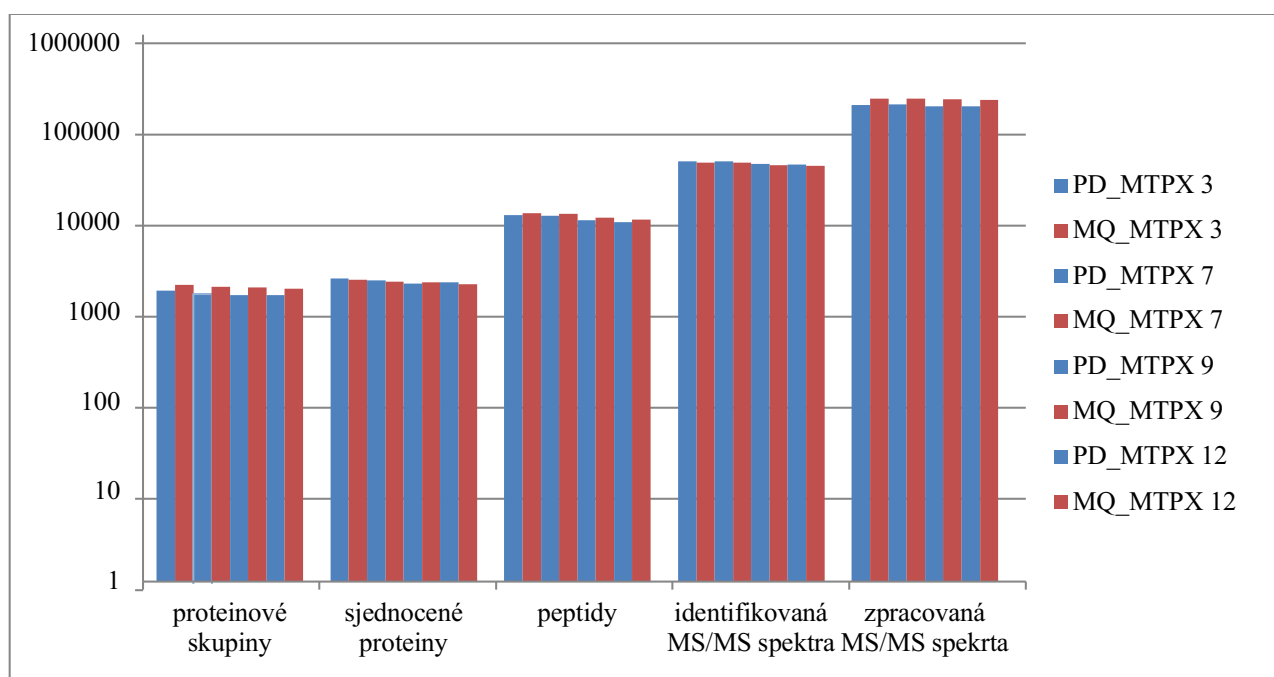


Obrázek 26: Porovnání počtu identifikací vzorků bez a po frakcionaci. Osa X je v logaritickém měřítku. Data opět pochází z optimalizačních fází této studie

Konečná LC – MS/MS analýza probíhala byla provedena ve 3 technických replikátech. Záznam full scanu dvou multiplexů je uveden v příloze (Příloha 2). Porovnání měření replikátů je uvedeno v příloze (Příloha 3). Nejprve byly změřeny všechny vzorky v prvním replikátu, následně v druhém a pak ve třetím. V sadách byl měřen stále stejný standard Cyt C (pouze nově rozmrazený z připravených zásob), aby se dala případný posun v retenčních časech či pokles senzitivity korigovat. Porovnání 3 šarží Cyt C je uvedeno v příloze (Příloha 4). Dále docházelo v průběhu měření k výměnám mobilních fází. Před pokračováním v analýze byly provedeny všechny běžné

testy na LC, kalibrace MS a proměřena řada standardů. Nebyl zaznamenán žádný významný posun v retenčních časech či změna senzitivity měření.

K vyhodnocení dat bylo možné využít dva programy: Proteome Discoverer Software (PD) (Thermo Fisher Scientific, USA) anebo volně dostupný program MaxQuant (MQ) (Max Planck Institute for Biochemistry, Německo). Tyto programy využívají odlišné vyhodnocovací strategie, rozdílné metody pro slučování proteinových skupin a také jinak pracují s modifikacemi a jsou jinak časově náročné. Graf (Obrázek 27) znázorňuje porovnání počtu získaných identifikací z jednotlivých programů po analýze 4 multiplexů. Parametry byly nastaveny co nejvíce shodně.



Obrázek 27: Porovnání programu PD (modrý) a MQ (červený) v množství získaných identifikací. Data jsou vyobrazena v logaritmickém měřítku

Po analýze prvního replikátu byla data nahrána do obou programů. Ačkoliv doba ke zpracování dat byla u PD kratší, po porovnání výsledků z obou programů byl zvolen MaxQuant pro celkovou analýzu. MaxQuant poskytoval více proteinových skupin i peptidů a celkových vstupů ale také větší množství modifikací.

Systematické odchylky v datech byly odstraněny pomocí loess normalizace v programu R, která je společně s lineární regrese či normalizací na medián běžně používanou v proteomických datech [88, 89]. Tento typ regrese byl pro tato data nejvhodnější. Dále byla data zpracována především

v programu Excel, a to pomocí jednoduchého t-testu, protože po zprůměrování hodnot z replikátů se jednalo o nezávislá data a bylo možné využít tohoto jednoduchého testu.

Proteomická analýza plodové vody nám umožnila hloubkově prozkoumat její složení a zaměřit se na potenciální biomarkery předčasného porodu. Díky této analýze jsme finálně identifikovali 18 dysregulovaných proteinů, jejichž hladiny se lišily na hladině významnosti 0,05 s absolutním rozdílem mezi pozorovanými skupinami (předčasný porod a termínový porod) o více než 0,2. Dva z těchto proteinů byly zvýšené (Lipocalin-15 and Chorionic somatomammotropin hormone 2), zbylé proteiny byly snižené v porovnání s kontrolní skupinou. Mnohé z těchto proteinů již byly ve studiích zaměřených na předčasný porod či jiné těhotenské komplikace zmíněné. Ne vždy však byly stanoveny v plodové vodě. V některých studiích byly tyto proteiny stanovené v cervikovaginální tekutině či séru či placentě [21].

Ani jeden z výše uvedených proteinů (Lipocalin-15 and Chorionic somatomammotropin hormone 2), které byly v této studii nalezeny ve vyšším zastoupení v pozitivní oproti kontrolní skupině nebyly dosud v proteomických studiích zmíněny ve vztahu k těhotenským komplikacím.

Lipocalin-15 patří do rozsáhlé skupiny lipokalinů, malých transportních molekul hrajících významnou roli v rozličných patologických stavech. Mnoho z nich bylo již velice podrobně posláno, o lipocalinu-15 se toho zatím příliš nezjistilo, pouze že se jedná o transportní a signální protein podílejících se i na metabolismu lipidů [90, 91].

Chorionic somatomammotropin hormone 2 se podílí na kaskádě procesů u signalizačních cest růstového hormonu [90].

Naopak některé proteiny ze skupiny downregulovaných v této studii již byly v souvislosti s těhotenskými komplikace i předčasným porodem specificky zmíněné. V cervikovaginální tekutině byly detekovány Plastin-2 a Rho GDP-dissociation inhibitor 2 [92].

Plastin-2 je aktin vázající protein, který se podílí na aktivaci T – buněk při imunitní odpovědi. Rho GDP-dissociation inhibitor 2 je signální molekula zapojená do mnoha procesů včetně apoptózy a regulačních procesů při výměně GDP/GTP [90].

Plasminogen activator inhibitor 1 byl identifikován v rámci studie plodové vody odebrané v časně fázi těhotenství (16.-18. týden těhotenství) ve fyziologickém stavu pomocí 2-DE a ESI-MS [93].

Jeho funkce je značně spojená s vývojem embrya a mnoho studií naznačuje, že může mít spojitost s náhlými potraty [94], preeklampsii, intrauterinní růstovou restrikcí plodu či těhotenskou cukrovkou. V těchto studiích byla hladina tohoto proteinu zaznamenána ve vyšší hladině oproti zdravým kontrolám, což je v rozporu s našimi výsledky, byla ovšem měřena v krvi, nikoliv v plodové vodě [95].

Dvě studie Tambor et al. provedené na pPROM vzorkách plodových vod poukazují na zvýšené hladiny Cathelicidin antimicrobial peptide u žen s mikrobiální invazí (MIAC) a histologickou chorioamnitidou (HCA), tedy rizikovým faktorem předčasného porodu [82, 83]. V druhé uvedené studii byl také identifikován Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Oba tyto proteiny byly ovšem v kontrolní skupině sniženy v porovnání se rizikovou skupinou (zde skupina s MIAC a HCA) a oba tyto proteiny byly v následných studiích verifikovány pomocí ELISA [82, 96]. Cathelicidin i NGAL byly v uvedených studiích signifikantně zvýšeny v porovnání s kontrolní skupinou.

Cathelicidin jako antimikrobiální peptid se schopností vázat se na lipopolysacharidy bakterií, čímž hraje klíčovou roli v obraně organismu. Mnoho studií provedených na cervikovaginální tekutině přichází taktéž s výsledky zvýšené hladiny cathelicidinu u žen s bakteriální vaginózou [97].

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin hraje klíčovou roli v imunitní obranyschopnosti organismu a slouží jako transportní molekula pro mnoho látek (retinoidy, arachidonová kyselina, prostaglandiny, mastné kyseliny, steroidy, železo a matrixmetaloproteinázy). Zvýšená hladina NGAL je podrobně popsána v mnoha studiích ve spojitosti se intraamniálním zánětem a infekcí [98].

Výsledky této studie jsou v tomto ohledu opačné. Důvodů může být hned několik. Byl použit jiný proteomický přístup. Přítomnost MIAC ani HCA nebyla na vzorkách využitých v této studii testována, taktéž nebyly vzorky odebrány po prasknutí plodových obalů pPROM ale v dřívější fázi těhotenství (14. - 17. v této studii vs. 24. - 35.tt). Je tedy možné, že výsledné rozdíly v expresi těchto proteinů mohly vzniknout právě z důvodů jiné doby odběru vzorků či faktem, že tyto validační studie pracovaly se vzorky pPROM. Porovnávání výsledků studií je velice obtížné, protože dynamika jednotlivých proteinů se může lišit v závislosti na čase a patologickém stavu a především biologickém materiálu, protože většina ostatních studií byla prováděna na séru, krvi

či cervikovaginální tekutině [97–99]. Ovšem nehledě na celkové hladiny, je jednoznačné, že jak v této, tak jiných studiích, jsou hladiny těchto proteinů dysregulované, lze tedy na základě těchto studií zařadit Cathelicidin a NGAL na panel potenciálních ukazatelů předčasného porodu. Potvrdit to ovšem mohou jen následné studie.

Mezi dalšími v předchozích studiích zmíněnými proteiny je Neutrophil defensin 1 a 3. Tyto proteiny jsou nejčastěji zmiňovány v kombinaci Neutrophil defensin 1 a 2 a Calgranuliny A a C pro určení takzvaného MR-skóre, což je hodnotící systém založený na přítomnosti či absenci píků těchto proteinů v SELDI profilování využívaného především ve studiích Buhimshi et al. zaměřených na těhotenské komplikace k potvrzení přítomnosti intraamniálního zánětu či infekce [70]. Porovnání s výsledky této studie lze opět pouze zhodnotit, že i v tomto případě byl neutrophil defensin nalezen mezi dysregulovanými proteiny při porovnání pozitivní a negativní skupiny pacientek. Jiné porovnání není patrně z důvodů zcela odlišného způsobu analýzy a vyhodnocení vzorků možné.

Mnoho studií ale bohužel stále nabízí pouhý výčet nalezených píků bez identifikace či kvantifikace [100]. A právě tento nedostatek v oblasti identifikace či kvantifikace je hlavním úskalím ve vývoji nových biomarkerů a jejich zavádění do klinické praxe. Aby mohl být biomarker zaveden, musí splňovat řadu kritérií, jak bylo již výše uvedeno. Především musí mít ale vysokou senzitivitu a specificitu. Oba tyto faktory jsou ovlivněny již naplánováním studie. Mnoho studií je ukončeno už po první (discovery) fázi (ať již záměrně či z důvodů nedostatku finančního, vzorků, času atd.).

Tento fakt je jedním velice významným úskalím vývoje nových biomarkerů. S nástupem “omic” přístupů se rapidně zvedl hlášený počet potenciálních biomarkerů. Což by mohlo velice významně pomoci pacientům při léčbě a také velmi snížit její celkovou cenu. Aby se takový biomarker dostal do klinické praxe, musí projít fází konfirmace a validace na stovkách rozličných vzorků a ideálně i odlišnými metodami (což může být velice komplikované z důvodu velice nízké opakovatelnosti a porovnatelnosti výsledku získaných rozdílnými metodami) a samozřejmě fází klinického testování. Výsledné hodnoty musí být reprodukovatelné, specifické a citlivé. Bohužel většina z publikovaných potenciálních biomarkerů nebyla dále podrobena verifikaci a/nebo validaci. Tímto většina těchto studií ztrácí na významnosti. Důvodů, proč je postup v zavádění nových biomarkerů do praxe, je mnoho, především to jsou chyby v celkovém naplánování studie

a/nebo její provedení. V první řadě je častým důvodem ukončení experimentu již po první (discovery) fázi, a to buď z důvodů finančních anebo bylo v první řadě pouze cílem identifikovat jen množství potenciálních biomarkerů bez následných studií. Dalším problémem, se kterým se studie potýkají a díky němuž se pak následné studie neprovádí, je malé množství původních vzorků, nedostatek informací o charakteru vzorku či jejich špatný výběr napříč populací vzhledem k pohlaví a věku a porovnání skupin (case vs. kontrolní), nedostatečná hloubková metabolická či proteomická analýza a nutnost dodržovat standardizované postupy pro přípravu z důvodu reprodukovatelnosti výsledků. V poslední řadě je nutné zmínit také zdlouhavé a finančně náročné zavádění do klinické praxe. Výzkumy dokazují, že valná část slibných biomarkerů se proto do praxe nedostane, poslouží ale alespoň pro detekci průběhu či fáze onemocnění u chorob s nízkou úrovní přežití [101].

Všem výše zmíněným úskalím jsme se snažili v této studii vyvarovat. Analýzou 60 vzorků plodových vod patří tato studie mezi jedny z největších se zaměřením na předčasný porod a jeho biomarkery v rané fázi těhotenství. Pro srovnání, obdobné studie, tedy bottom-up proteomické studie zaměřené na těhotenské komplikace (PPROM, preeklampsie, Downův, Turnerův a Klineferterův syndrom či PB) prováděné na plodové vodě odebrané v rané fázi, tedy 15. - 20. gestační týden, byly založené na analýze 10 až 54 vzorků (v průměru 20) [102–110]. Z dosud nepublikovaných dat připravovaného souhrnného přehledu, kde jsme analyzovali 71 proteomických studiích provedených na plodové vodě rozličnými technologiemi, vyplývá, že v průměru tyto práce analyzovaly 31 vzorků. Ačkoliv se objevují i rozsáhlé studie analyzující 258 vzorků [111].

Ke vzorkům byla dále k dispozici i rozsáhlá anamnézu. Proteomická analýza byla provedena pomocí multidimenzionálních přístupů, abychom co nejvíce snížili komplexitu vzorků a všechny postupy podléhaly standardizovanému protokolu.

Výsledky této studie byly dále podrobeny validační a replikační fázi. Následné práce byly provedeny pomocí ELISA ve spolupráci se vědeckým týmem. Na základě výsledků z explorativní fáze proteomické studie bylo pro tyto následné práce po adjustaci dat vzhledem ke gestačnímu stáří a dysregulaci proteinů mezi skupinami o 0,2 v absolutní hodnotě, přijato 9 proteinů. Kvůli

technickým limitacím ELISA kitů nebylo možné validační práce provést na třech proteinech (insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5/P24593), insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP-7/Q16270) and semaphorin-3B (SEMA A (V)/Q13214), proto byly práce provedeny pouze pro 6 těchto proteinů: Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC-SOD/P08294), Lipocalin-15 (LCN15/Q6UWW0), Microfibril-associated glycoprotein 4 (MFAP4/P55083), Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL/P80188), Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1/P05121) a Urotensin-2 (U-II/O95399).

Následné práce byly rozděleny do dvou fází, validační fáze, která byla provedena na stejné kohortě vzorků jako proteomická analýza a následná replikační fáze byla provedena na odlišné kohortě. Validační fáze potvrdila výsledky proteomické části studie u dvou ze šesti testovaných proteinů. Dva proteiny prošly validační fází, NGAL a PAI-1 a potvrdily výsledky proteomické explorativní analýzy. I v této části se prokázaly být významně snižené v pozitivní skupině pacientek v porovnání s kontrolní skupinou. Replikační fáze, která pracovala s 20 pozitivními a 40 negativními vzorky už tento trend neodhalila [112]. I tak se ale opět NGAL a PAI-1 dostal na seznam dysregulovaných proteinů, tedy potenciálních kandidátů biomarkerů využitelných k predikci předčasného porodu.

Důvodů proč se nepotvrdily výsledky i u dalších proteinů může být několik. Částečně to může být způsobené porovnáváním výsledků iTRAQ analýzy pracující s relativními hladinami proteinů a ELISA metodou, která porovnáme absolutní koncentrace, dále také v lehce odlišném přístupu při zpracování výsledných dat a statistické analýze.

Všechny tyto teorie je ovšem potřeba ověřit následnými podrobnými studiemi, které až pak mohou vést k sestavení panelů biomarkerů k predikci předčasného porodu v takto rané fázi těhotenství.



## 7. Závěr

Předčasný porod, jak bylo již uvedeno v úvodu, je zodpovědný za 70–80 % případů novorozenecké úmrtnosti a za víc jak polovinu dlouhodobé nemoci. Zvyšuje riziko neurologických, respiračních a gastrointestinálních onemocnění a dalších novorozeneckých komplikací a výrazně se podílí na zvýšení finanční náročnosti zdravotní péče jak pro společnost, tak pro jednotlivce a psychickou zátěž pro rodinu nezapomínáje. Ačkoliv se celková péče o novorozence i rodiny postižené předčasným porodem stále zlepšuje, včasná diagnostika může i nadále tento problém snižovat.

Tato práce přinesla důležité poznatky o charakteru plodové vody ve střední rané fázi těhotenství. Silnou stránkou celé studie je důmyslná metodologie, standardizované protokoly při nakládání se vzorky, a především v porovnání s jinými studiemi, velký počet vzorků. K odběru plodové vody dochází pouze z důvodu podezření na možná rizika, skupina pacientek tedy nereprezentuje širokou populaci ať už z pohledu vyššího věku či etnicity (pouze ženy, které uměly švédsky a byly schopné tedy podepsat informovaný souhlas s použitím plodové vody ve studii byly přijaty). To může být považováno za limitaci z důvodu nemožnosti generalizace těchto výsledků. Jiná cesta ovšem zatím není.

Díky rozsáhlým studiím, které byly v tomto oboru provedeny, lze vytvořit seznam proteinů, které je možné zařadit do panelu potenciálních ukazatelů předčasného porodu. Ačkoliv je mnoho z nich ještě potřeba ověřit nezávislými testy (ELISA či SRM a jiné), je alespoň z čeho vycházet. Po ověření těchto výsledků bude snad možné tyto markery identifikovat v jiném biologickém materiálu, než je plodová voda. Ačkoliv je riziko spojené s jejím odběrem minimální, stále se jedná o invazivní metodu a analýza biomarkerů předčasného porodu z krevní plazmy, séra či cervikovaginální tekutiny by byla pro pacienty jistě přijatelnější.

V současné době se pro odhad rizika předčasného porodu využívá kombinace mnoha časově i finančně náročných metod jako je měření délky čípku, bedside testy na detekci fetálního fibronektinu, insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1), interleukin-6 a placentárního alpha-macroglobulin-1. V úvahu se také bere zdravotní anamnéza matky, její celkový zdravotní stav i socioekonomický status. Avšak celkový pokrok v jasné identifikaci příčin předčasného porodu, který by vedl ke snížení rizik a incidence, je ovšem stále velice komplikovaný faktem, že se jedná o multifaktoriální syndrom a mnohé faktory nám jsou ještě stále neznámé.

## 8. Seznam použité literatury

- [1] GOLDENBERG, Robert L, Jennifer F CULHANE, Jay D IAMS a Roberto ROMERO. Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet* [online]. 2008, **371**(9606), 75–84. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(08)60074-4
- [2] KOUCK, Michal, Jan SMĚK, Antonín PAZEK a Marian KACEROVSK. *Spontánní předčasný porod*. Praha: Maxdorf, 2014. ISBN 978-80-7345-416-6.
- [3] MAREOV, Pavlína. *Moderní postupy v gynekologii a porodnictví*. Praha: Mladá Fronta: Edice Postgraduální medicíny, 2014. ISBN 978-80-204-3153-0.
- [4] DUDASOVA J, P SIMJAK, M KOUCKY a A PARIZEK. Current options of prediction of preterm labour. *Česká gynekologie*. 2019, **84**(5), 355–360. ISSN 1210-7832 (Tisk).
- [5] KACEROVSK, M a I MUSILOV. [Management of preterm prelabor rupture of membranes with respect to the inflammatory complications – our experiences]. *Česká gynekologie* [online]. 2013, **78**(6), 509–13. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372427>
- [6] PETRK, J. [Proteomics and its role in medicine]. *Časopis lékařů českých* [online]. 2005, **144**(6), 365–70; discussion 370-1. ISSN 0008-7335. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16047837>
- [7] KOUCK, M, A GERMANOV, Z HJEK, A PARZEK, M KALOUSOV a P KOPECK. [News in pathophysiology and management of preterm labour]. *Česká gynekologie* [online]. 2009, **74**(1), 54–63. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19408855>
- [8] AKOLEKAR, R, J BETA, G PICCIARELLI, C OGILVIE a F DANTONIO. Procedure - related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [online]. 2015, **45**(1), 16–26. ISSN 1469-0705. Dostupné z: doi:10.1002/uog.14636
- [9] KACEROVSK, KO KRDOV, KOUCK, KEPELKA, et al. Spontánní předčasný porod Doporučený postup. *ČGPS ČLS JEP* [online]. 2017. Dostupné

z: <https://www.prolekare.cz/vyhledavanicontentTypeIdsearchSpontán ní+předčasný+porod+Doporučený+postupsearch -submit>

- [10] VOKROJ, J a L ARNOSTOV. [Preeclampsia --possibly prediction markers]. *Česká gynekologie* [online]. 2009, **74**(4), 256–61. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20564978>
- [11] KIM, Min-Sik, Sneha M PINTO, Derese GETNET, et al. A draft map of the human proteome. *Nature* [online]. 2014, **509**(7502), 575–81. ISSN 1476-4687. Dostupné z: [doi:10.1038/nature13302](https://doi.org/10.1038/nature13302)
- [12] WILHELM, M, J SCHLEGL, H HAHNE, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* [online]. 2014, **509**(7502), 582–587. ISSN 1476-4687. Dostupné z: [doi:10.1038/nature13319](https://doi.org/10.1038/nature13319)
- [13] HERNYCHOV, Lenka, Petra DVOKOV, Eva MICHALOV a Bořivoj VOJTEK. Quantitative Mass Spectrometry and Its Utilization in Oncology. *Klinická onkologie* [online]. 2014, **27**(Suppl 1), S98–S103. ISSN 0862495X. Dostupné z: [doi:10.14735/amko20141S98](https://doi.org/10.14735/amko20141S98)
- [14] KLEIN, J, B BUFFIN-MEYER, W MULLEN, et al. Clinical proteomics in obstetrics and neonatology. *Expert review of proteomics* [online]. 2014, **11**(1), 75–89. ISSN 1744-8387; 1478-9450. Dostupné z: [doi:10.1586/14789450.2014.872564](https://doi.org/10.1586/14789450.2014.872564) [doi]
- [15] BIZZINI, A a G GREUB. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [online]. 2010, **16**(11), 1614–1619. ISSN 1469-0691. Dostupné z: [doi:0.1111/j.1469-0691.2010.03311](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03311)
- [16] HSUEH, P R, L C KUO, T C CHANG, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of blood isolates of *Acinetobacter* species. *Journal of clinical microbiology* [online]. 2014, **52**(8), 3095–3100. ISSN 1098-660. Dostupné z: [doi:10.1128/JCM.01233-14](https://doi.org/10.1128/JCM.01233-14)

- [17] CESKOVA, Pavla, Kristýna BROZOVA, Lenka HERNYCHOVA, et al. [Mass Spectrometry in Quantitative and Diagnostic Proteomics: Potentials and Limitations]. *Chemické Listy* [online]. 2006, **100**(11), 974–979. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1870>
- [18] CHMELIK, Josef. [Proteomic Guide]. *Chemické Listy* [online]. 2005, **99**(12), 883–885. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1963/1963>
- [19] CHEN, Bifan, Kyle A BROWN, Ziqing LIN a Ying GE. Top-Down Proteomics: Ready for Prime Time *Analytical chemistry* [online]. 2018, **90**(1), 110–127. ISSN 1520-6882 (Electronic). Dostupné z: [doi:10.1021/acs.analchem.7b04747](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04747)
- [20] CUI, W, H W ROHRS a M L GROSS. Top-down mass spectrometry: recent developments, applications and perspectives. *The Analyst* [online]. 2011, **136**(19), 3854–3864. ISSN 1364-5528. Dostupné z: [doi:10.1039/c1an15286f](https://doi.org/10.1039/c1an15286f)
- [21] LIEBLER, Daniel C. *Introduction to proteomics tools for the new biology* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. ISBN 0585418799. Dostupné z: <http://site.ebrary.com/id/10181181>
- [22] BURKHART, Julia Maria, Cornelia SCHUMBRUTZKI, Stefanie WORTELKAMP, et al. Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of Proteomics* [online]. 2012, **75**(4), 1454–1462. ISSN 1874-3919. Dostupné z: [doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.016](http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.016)
- [23] ZHANG, Y, B R FONSLow, B SHAN, M C BAEK a J R YATES 3RD. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews* [online]. 2013, **113**(4), 2343–2394. ISSN 1520-6890; 0009-2665. Dostupné z: [doi:10.1021/cr3003533](https://doi.org/10.1021/cr3003533) [doi]
- [24] CARROLL, J, I M FEARNLEY a J E WALKER. Definition of the mitochondrial proteome by measurement of molecular masses of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2011, **10**(2), R110.000935. ISSN 0027-8424. Dostupné z: [doi:10.1074/mcp.R110.000935](https://doi.org/10.1074/mcp.R110.000935)

- [25] BANTSCHIEFF, M a B KUSTER. Quantitative mass spectrometry in proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. 2012, **404**, 937. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6261-7
- [26] BAGGERMAN, Geert, Evy VIERSTRAETE, Arnold DE LOOF a Liliane SCHOOF. Gel-Based Versus Gel-Free Proteomics: A Review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* [online]. 2005. ISSN 13862073. Dostupné z: doi:10.2174/138620705774962490
- [27] FINOULST, I, M PINKSE, W VAN DONGEN a P VERHAERT. Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices. *Journal of biomedicine & biotechnology* [online]. 2011, **2011**, 1–14. ISSN 1110-7251. Dostupné z: doi:10.1155/2011/245291 [doi]
- [28] DVORAKOVA, P, L HERNYCHOVA a B VOJTESEK. [Analysis of protein using mass spectrometry]. *Klinicka onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti* [online]. 2014, **27 Suppl 1**, S104-9. ISSN 0862-495X. Dostupné z: doi:48883 [pii]
- [29] HAIDAR AHMAD, I A, A SOLIVEN, R C ALLEN, M FILGUEIRA a P W CARR. Comparison of core-shell particles and sub-2µm fully porous particles for use as ultrafast second dimension columns in two-dimensional liquid chromatography. *Journal of chromatography A* [online]. 2015, **1386**(20), 31–38. ISSN 1873-3778. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.11.069
- [30] WOLTERS, Dirk A, Michael P WASHBURN a John R YATES. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical chemistry* [online]. 2001, **73**(23), 5683–90. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac010617e
- [31] SMITH, M P, S L WOOD, A ZOUGMAN, et al. A systematic analysis of the effects of increasing degrees of serum immunodepletion in terms of depth of coverage and other key aspects in top-down and bottom-up proteomic analyses. *Proteomics* [online]. 2011, **11**(11), 2222–2235. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201100005 [doi]

- [32] HOLCAPEK, M, R JIRASKO a M LISA. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1259**, 3–15. ISSN 1873-3778. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.08.072 [doi]
- [33] TANAKA, Koichi, Hiroaki WAKI, Yutaka IDO, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 1988, **2**(8), 151–153. ISSN 1097-0231. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.1290020802
- [34] MUSILOV, I, M KACEROVSK, V TAMBOR a J TOSNER. [Proteomics and biomarkers for detection of preterm labor: a systematic review]. *Česká gynekologie* [online]. 2011, **76**(1), 37–45. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21656999>
- [35] FENN, J B, M MANN, C K MENG, S F WONG a C M WHITEHOUSE. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 1989, **246**(4926), 64–71. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.2675315
- [36] ARDREY, R E. *Liquid chromatography-mass spectrometry an introduction* [online]. West Sussex, England; Hoboken, NJ: John Wiley Sons , 2003, 2003. ISBN 0470862173. Dostupné z: <http://search.ebscohost.com/login.aspxdirecttruescopesitedbnlebkdbnlabkAN85986>
- [37] HOFFMANN DE., Edmond, Vincent STROOBANT a Edmond de. HOFFMANN STROOBANT, VINCENT., *Mass spectrometry : principles and applications*. Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: J. Wiley, 2007. ISBN 9780470033104.
- [38] AEBERSOLD, R a M MANN. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* [online]. 2003, **422**(6928), 198–207. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature01511 [doi]
- [39] ZHANG, Yi, Scott B FICARRO, Shaojuan LI a Jarrod A MARTO. Optimized Orbitrap HCD for Quantitative Analysis of Phosphopeptides. *Journal of the American Society for*

- Mass Spectrometry* [online]. 2009, **20**(8), 1425–1434. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2009.03.019>
- [40] ZUBAREV, Roman A, David M HORN, Einar K FRIDRIKSSON, et al. Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cations. *Analytical chemistry* [online]. 2000, **72**(3), 563–73. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:[10.1021/ac990811p](https://doi.org/10.1021/ac990811p)
- [41] DOERR, Allison. Mass spectrometry-based targeted proteomics. *Nature methods* [online]. 2013, **10**(1), 23. ISSN 1548-7105 (Electronic). Dostupné z: doi:[10.1038/nmeth.2286](https://doi.org/10.1038/nmeth.2286)
- [42] GILLET, L C, P NAVARRO, S TATE, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Molecular & cellular proteomics* [online]. 2012, **11**(6), 1–17. ISSN 1535-9484. Dostupné z: doi:[10.1074/mcp.O111.016717](https://doi.org/10.1074/mcp.O111.016717)
- [43] HU, Alex, William S. NOBLE a Alejandro WOLF-YADLIN. Technical advances in proteomics: new developments in data-independent acquisition. *F1000Research* [online]. 2016, **5**, 419. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:[10.12688/f1000research.7042.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.7042.1)
- [44] FRIEDECK, D a K LEMR. vod do hmotnostní spektrometrie, 1. díl. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. 2012, **20**(41), 152–157. ISSN 12107921.
- [45] GZEL, Cokun, Natalia I GOVORUKHINA, Christoph STINGL, et al. Comparison of Targeted Mass Spectrometry Techniques with an Immunoassay: A Case Study for HSP90. *Proteomics. Clinical applications* [online]. 2018, **12**(1). ISSN 1862-8354 (Electronic). Dostupné z: doi:[10.1002/prca.201700107](https://doi.org/10.1002/prca.201700107)
- [46] GREGORICH, Z R a Y GE. Top-down proteomics in health and disease: challenges and opportunities. *Proteomics* [online]. 2014, **14**(10), 1195–1210. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:[10.1002/pmic.201300432](https://doi.org/10.1002/pmic.201300432)
- [47] CATHERMAN, A D, O S SKINNER a N L KELLEHER. Top Down proteomics: facts and perspectives. *Biochemical and biophysical research communications* [online]. 2014,

- 445**(4), 683–693. ISSN 1090-2104; 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2014.02.041 [doi]
- [48] COX, Jürgen a Matthias MANN. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* [online]. 2008, **26**(12), 1367–1372. ISSN 1546-1696 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1038/nbt.1511
- [49] TATE, Stephen, Brett LARSEN, Ron BONNER a Anne-Claude GINGRAS. Label-free quantitative proteomics trends for protein–protein interactions. *Journal of Proteomics; Special Issue: From protein structures to clinical applications* [online]. 2013, **81**, 91–101. ISSN 1874-3919. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.10.027
- [50] COOMBS, Kevin M. Quantitative proteomics of complex mixtures. *Expert review of proteomics* [online]. 2011, **8**(5), 659–77. ISSN 1744-8387. Dostupné z: doi:10.1586/epr.11.55
- [51] BANTSCHIEFF, Marcus, Markus SCHIRLE, Gavain SWEETMAN, et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007, **389**(4), 1017–1031. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1486-6
- [52] GEIGER, T, J COX, P OSTASIEWICZ, et al. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nature methods* [online]. 2010, **7**(5), 383–385. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1446
- [53] CHAHROUR, Osama, Diego COBICE a John MALONE. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, **113**, 2–20. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.04.013
- [54] DAYON, L, A HAINARD, V LICKER, et al. Relative Quantification of Proteins in Human Cerebrospinal Fluids by MS/MS Using 6-Plex Isobaric Tags. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, **80**(8), 2921–2931. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac702422x



- [55] VAN ULSEN, Peter, Karsten KUHN, Thorsten PRINZ, et al. Identification of proteins of *Neisseria meningitidis* induced under iron-limiting conditions using the isobaric tandem mass tag (TMT) labeling approach. *Proteomics* [online]. 2009, **9**(7), 1771–1781. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200800642
- [56] SAVITSKI, Mikhail M, Toby MATHIESON, Nico ZINN, et al. Measuring and managing ratio compression for accurate iTRAQ/TMT quantification. *Journal of proteome research* [online]. 2013, **12**(8), 3586–3598. ISSN 1535-3907 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1021/pr400098r
- [57] RAUNIYAR, Navin a John R. YATES. Isobaric Labeling-Based Relative Quantification in Shotgun Proteomics. *Journal of Proteome Research* [online]. 2014, **13**(12), 5293–5309. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr500880b
- [58] VINER, Rosa I, Terry ZHANG, Tonya SECOND a Vlad ZABROUSKOV. Quantification of post-translationally modified peptides of bovine crystallin using tandem mass tags and electron transfer dissociation. *Journal of Proteomics; Special Section: "From Genome to Proteome: Integration and proteome completion"* [online]. 2009, **72**(5), 874–885. ISSN 1874-3919. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.02.005
- [59] CASEY, Tammy M, Javed M KHAN, Scott D BRINGANS, et al. Analysis of Reproducibility of Proteome Coverage and Quantitation Using Isobaric Mass Tags (iTRAQ and TMT). *Journal of proteome research* [online]. 2017, **16**(2), 384–392. ISSN 1535-3907 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.5b01154
- [60] ANAND, Sushma, Monisha SAMUEL, Ching-Seng ANG, et al. Label-Based and Label-Free Strategies for Protein Quantitation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2017, **1549**, 31–43. ISSN 1940-6029 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6740-74
- [61] HOGREBE, Alexander, Louise VON STECHOW, Dorte B BEKKER-JENSEN, et al. Benchmarking common quantification strategies for large-scale phosphoproteomics. *Nature communications* [online]. 2018, **9**(1), 1045. ISSN 2041-1723 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-03309-6

- [62] COX, J, M Y HEIN, C A LUBER, I PARON, et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Molecular & cellular proteomics* [online]. 2014, **13**(9), 2513–2526. ISSN 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M113.031591
- [63] SUFF, Natalie, Lisa STORY a Andrew SHENNAN. The prediction of preterm delivery: What is new *Seminars in fetal & neonatal medicine* [online]. 2019, **24**(1), 27–32. ISSN 1878-0946 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.siny.2018.09.006
- [64] OSKOVI KAPLAN, Zeynep Asli a A Seval OZGU-ERDINC. Prediction of Preterm Birth: Maternal Characteristics, Ultrasound Markers, and Biomarkers: An Updated Overview. *Journal of Pregnancy* [online]. 2018, **2018**, 1–8. ISSN 2090-2727. Dostupné z: doi:10.1155/2018/8367571
- [65] GLOVER, Angelica V a Tracy A MANUCK. Screening for spontaneous preterm birth and resultant therapies to reduce neonatal morbidity and mortality: A review. *Seminars in fetal & neonatal medicine* [online]. 2018, **23**(2), 126–132. ISSN 1878-0946 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.siny.2017.11.007
- [66] TAMBOR, V, A FUCKOV, J LENCO, et al. Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiological research* [online]. 2010, **59**(4), 471–97. ISSN 0862-8408. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929137>
- [67] KOUCKY, M, Z HAJEK a A PARIZEK. [Diagnosis and management of infection and its role in preterm labor]. *Česká gynekologie / Česká lékařská společnost J.Ev.Purkyne*. 2006, **71**(1), 6–13. ISSN 1210-7832.
- [68] KACEROVSK, M, J TOSNER, C ANDRS, et al. [Amniotic fluid heat shock protein 70 concentration in preterm premature rupture of membranes]. *Česká gynekologie* [online]. 2009, **74**(2), 85–91. ISSN 1210-7832. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514653>
- [69] TOTH, B, U JESCHKE, N ROGENHOFER, et al. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *Journal of reproductive immunology* [online]. 2010,

- 85**(1), 25–32. ISSN 1872-7603; 0165-0378. Dostupné z: doi:10.1016/j.jri.2009.12.006 [doi]
- [70] BUHIMSCHI, Irina A., Rob CHRISTNER a Catalin S. BUHIMSCHI. Proteomic biomarker analysis of amniotic fluid for identification of intra-amniotic inflammation. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* [online]. 2005, **112**(2), 173–181. ISSN 14700328. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0528.2004.00340.x
- [71] MENON, R, M R TORLONI, C VOLTOLINI, et al. Biomarkers of spontaneous preterm birth: an overview of the literature in the last four decades. *Reproductive sciences* [online]. 2011, **18**(11), 1046–1070. ISSN 1933-7205. Dostupné z: doi:10.1177/1933719111415548.
- [72] GOODFELLOW, L, A CARE, A SHARP, et al. Effect of QUIPP prediction algorithm on treatment decisions in women with a previous preterm birth: a prospective cohort study. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* [online]. 2019, **126**(13), 1569–1575. ISSN 1471-0528 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1111/1471-0528.15886
- [73] TSIATSIANI, Liana a Albert J R HECK. Proteomics beyond trypsin. *The FEBS journal* [online]. 2015, **282**(14), 2612–2626. ISSN 1742-4658 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1111/febs.13287
- [74] CHO, Chan-Kyung K J, Shannon J SHAN, Elizabeth J WINSOR a Eleftherios P DIAMANDIS. Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2007, **6**(8), 1406–1415. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M700090-MCP200
- [75] ECHAN, L A, H Y TANG, N ALI-KHAN, et al. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* [online]. 2005, **5**(13), 3292–3303. ISSN 1615-9853; 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200401228 [doi]
- [76] BRAND, J, T HASLBERGER, W ZOLG, et al. Depletion efficiency and recovery of trace markers from a multiparameter immunodepletion column. *Proteomics* [online]. 2006,

- 6(11), 3236–3242. ISSN 1615-9853; 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200500864 [doi]
- [77] TU, C, P A RUDNICK, M Y MARTINEZ, et al. Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *Journal of proteome research* [online]. 2010, **9**(10), 4982–4991. ISSN 1535-3907; 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr100646w [doi]
- [78] ROCHE, S, L TIERS, M PROVANSAL, et al. Depletion of one, six, twelve or twenty major blood proteins before proteomic analysis: the more the better *Journal of proteomics* [online]. 2009, **72**(6), 945–951. ISSN 1876-7737. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2009.03.008 [doi]
- [79] FISHER, W G, Lucas J E, Mehdi U F, et al. A method for isolation and identification of urinary biomarkers in patients with diabetic nephropathy. *Proteomics.Clinical applications* [online]. 2011, **5**(11–12), 603–612. ISSN 1862-8354. Dostupné z: doi:10.1002/prca.201000156
- [80] SHORES, Kevin S a Daniel R KNAPP. Assessment approach for evaluating high abundance protein depletion methods for cerebrospinal fluid (CSF) proteomic analysis. *Journal of proteome research* [online]. 2007, **6**(9), 3739–51. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr070293w
- [81] BERLE, M, A C KROKSVEEN, H GARBERG, et al. Quantitative proteomics comparison of arachnoid cyst fluid and cerebrospinal fluid collected perioperatively from arachnoid cyst patients. *Fluids and barriers of the CNS* [online]. 2013, **10**(1), 17. ISSN 2045-8118. Dostupné z: doi:10.1186/2045-8118-10-17
- [82] TAMBOR, Vojtech, Marian KACEROVSKY, Ctirad ANDRYS, et al. Amniotic Fluid Cathelicidin in PPRM Pregnancies: From Proteomic Discovery to Assessing Its Potential in Inflammatory Complications Diagnosis. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(7), e41164–e41164. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0041164
- [83] TAMBOR, V, M KACEROVSKY, J LENCO, et al. Proteomics and bioinformatics analysis reveal underlying pathways of infection associated histologic chorioamnionitis in

- pPROM. *Placenta* [online]. 2013, **34**(2), 155–161. ISSN 0143-4004. Dostupné z: doi:10.1016/j.placenta.2012.11.028
- [84] TAMBOR, V., M. VAJRYCHOVA, M. KACEROVSKY, et al. Potential peripartum markers of infectious-inflammatory complications in spontaneous preterm birth. *BioMed Research International* [online]. 2015, **2015**. ISSN 23146141 23146133. Dostupné z: doi:10.1155/2015/343501
- [85] WU, Zhen, Jichang HUANG, Jingnan HUANG, et al. Lys-C/Arg-C, a More Specific and Efficient Digestion Approach for Proteomics Studies. *Analytical chemistry* [online]. 2018, **90**(16), 9700–9707. ISSN 1520-6882 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b02448
- [86] HAKOBYAN, Anna, Martin Bernd SCHNEIDER, Werner LIESACK a Timo GLATTER. Efficient Tandem LysC/Trypsin Digestion in Detergent Conditions. *PROTEOMICS* [online]. 2019, **19**(20), 1900136. ISSN 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201900136
- [87] GILAR, Martin, Petra OLIVOVA, Amy E. DALY a John C. GEBLER. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry* [online]. 2005. ISSN 00032700. Dostupné z: doi:10.1021/ac050923i
- [88] VLIKANGAS, Tommi, Tomi SUOMI a Laura L ELO. A systematic evaluation of normalization methods in quantitative label-free proteomics. *Briefings in bioinformatics* [online]. 2018, **19**(1), 1–11. ISSN 1477-4054 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1093/bib/bbw095
- [89] CALLISTER, Stephen J, Richard C BARRY, Joshua N ADKINS, et al. Normalization approaches for removing systematic biases associated with mass spectrometry and label-free proteomics. *Journal of proteome research* [online]. 2006, **5**(2), 277–286. ISSN 1535-3893 (Print). Dostupné z: doi:10.1021/pr050300l
- [90] *DAVID Bioinformatics Resources 6.8* [online]. [accessed. 2020-05-04]. Dostupné z: <https://david.ncifcrf.gov/>

- [91] DU, Ze-Peng, Bing-Li WU, Xuan WU, et al. A systematic analysis of human lipocalin family and its expression in esophageal carcinoma. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1), 12010. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep12010
- [92] KACEROVSKY, Marian, Juraj LENCO, Ivana MUSILOVA, et al. Proteomic biomarkers for spontaneous preterm birth: a systematic review of the literature. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* [online]. 2014, **21**(3), 283–295. ISSN 1933-7205 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1177/1933719113503415
- [93] GIANAZZA, Elisabetta, Robin WAIT, Shaina BEGUM, et al. Mapping the 5-50-kDa fraction of human amniotic fluid proteins by 2-DE and ESI-MS. *Proteomics - Clinical Applications* [online]. 2007, **1**(2), 167–175. ISSN 18628346. Dostupné z: doi:10.1002/prca.200600543
- [94] CHEN, Hui, Shuping NIE a Ming LU. Association between plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* [online]. 2015, **73**(4), 292–300. ISSN 1600-0897 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1111/aji.12321
- [95] YE, Yao, Aurelia VATTAI, Xi ZHANG, Junyan ZHU, et al. Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Pathologies of Female Reproductive Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(8), 1651. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18081651
- [96] VAJRYCHOVA, Marie, Marian KACEROVSKY, Vojtech TAMBOR, et al. Microbial invasion and histological chorioamnionitis upregulate neutrophil-gelatinase associated lipocalin in preterm prelabor rupture of membranes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* [online]. 2016, **29**(1), 12–21. ISSN 1476-7058. Dostupné z: doi:10.3109/14767058.2014.991305

- [97] FREW, Lorraine, Sofia MAKIEVA, Andrew T M MCKINLAY, et al. Human Cathelicidin Production by the Cervix. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(8), e103434. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0103434
- [98] TADESSE, Serkalem, Guoyang LUO, Joong Shin PARK, et al. Intra-amniotic infection upregulates neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression at the maternal-fetal interface at term: implications for infection-related preterm birth. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* [online]. 2011, **18**(8), 713–722. ISSN 1933-7205 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1177/1933719110396722
- [99] ROOD, Kara M, Irina A BUHIMSCHI, Katherine RODEWALD MILLEN, et al. Evidence for participation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin/matrix metalloproteinase-9 (NGALMMP -9) complex in the inflammatory response to infection in pregnancies complicated by preterm birth. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* [online]. 2016, **76**(2), 108–117. ISSN 1600-0897 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1111/aji.12523
- [100] STELLA, Caroline L., Michael R. BENNETT, Prasad DEVARAJAN, et al. Preterm labor biomarker discovery in serum using 3 proteomic profiling methodologies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* [online]. 2009, **201**(4), 387.e1-387.e13. ISSN 00029378. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajog.2009.06.034
- [101] DRUCKER, Elisabeth a Kurt KRAPPENBAUER. *Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine* [online]. 2013. ISSN 18785085. Dostupné z: doi:10.1186/1878-5085-4-7
- [102] VUADENS, Franoise, Corinne BENAY, David CRETZAZ, et al. Identification of biologic markers of the premature rupture of fetal membranes: proteomic approach. *Proteomics* [online]. 2003, **3**(8), 1521–5. ISSN 1615-9853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200300455
- [103] VASCOTTO, Carlo, Anna Maria SALZANO, Chiara DAMBROSIO, et al. Oxidized transthyretin in amniotic fluid as an early marker of preeclampsia. *Journal of proteome*

- research* [online]. 2007, **6**(1), 160–70. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr060315z
- [104] MAVROU, Ariadni, Athanasios K ANAGNOSTOPOULOS, Aggeliki KOLIALEXI, et al. Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Turner syndrome fetuses. *Journal of proteome research* [online]. 2008, **7**(5), 1862–6. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr700588u
- [105] PARK, Jisook, Dong-Hyun CHA, Jin Woo JUNG, et al. Comparative proteomic analysis of human amniotic fluid supernatants with Down syndrome using mass spectrometry. *Journal of microbiology and biotechnology* [online]. 2010, **20**(6), 959–67. ISSN 1017-7825. Dostupné z: doi:10.4014/jmb.0912.12035
- [106] ANAGNOSTOPOULOS, Athanasios K, Aggeliki KOLIALEXI, Ariadni MAVROU, et al. Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Klinefelter syndrome foetuses. *Journal of proteomics* [online]. 2010, **73**(5), 943–50. ISSN 1876-7737. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2009.12.009
- [107] CHO, Chan-Kyung J, Christopher R SMITH a Eleftherios P DIAMANDIS. Amniotic fluid proteome analysis from Down syndrome pregnancies for biomarker discovery. *Journal of proteome research* [online]. 2010, **9**(7), 3574–82. ISSN 1535-3907. Dostupné z: doi:10.1021/pr100088k
- [108] CHO, Chan-Kyung J, Andrei P DRABOVICH, Ihor BATRUCH a Eleftherios P DIAMANDIS. Verification of a biomarker discovery approach for detection of Down syndrome in amniotic fluid via multiplex selected reaction monitoring (SRM) assay. *Journal of proteomics* [online]. 2011, **74**(10), 2052–9. ISSN 1876-7737. Dostupné z: doi:10.1016/j.jprot.2011.05.025
- [109] CHENG, Po-Jen, Tzu-Hao WANG, Shang-Yu HUANG, et al. Differential proteomics analysis of amniotic fluid in pregnancies of increased nuchal translucency with normal karyotype. *Prenatal diagnosis* [online]. 2011, **31**(3), 274–81. ISSN 1097-0223. Dostupné z: doi:10.1002/pd.2719

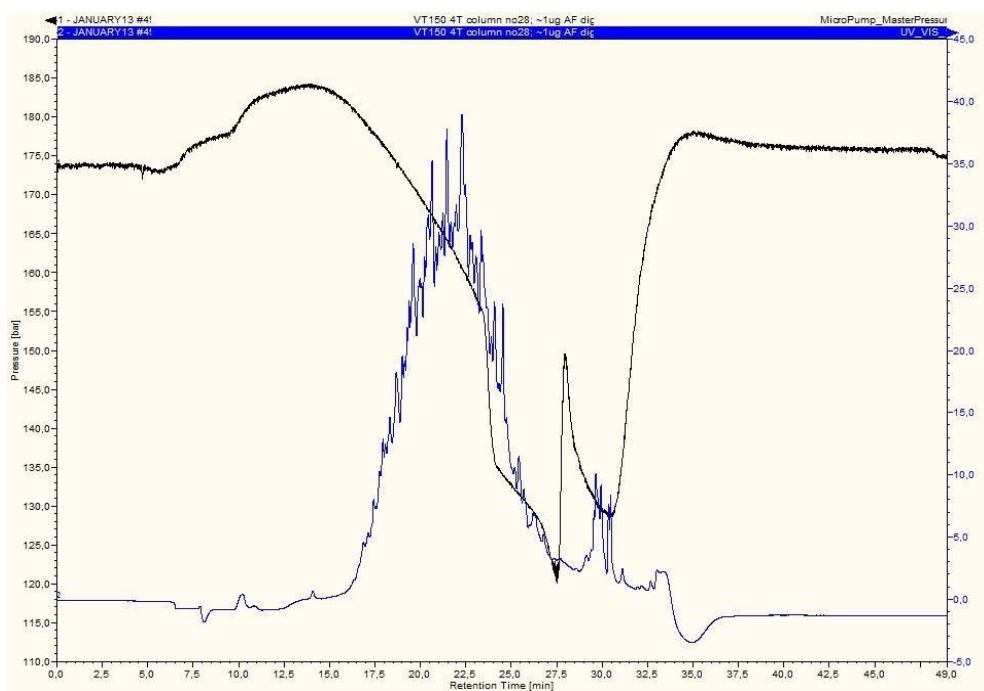
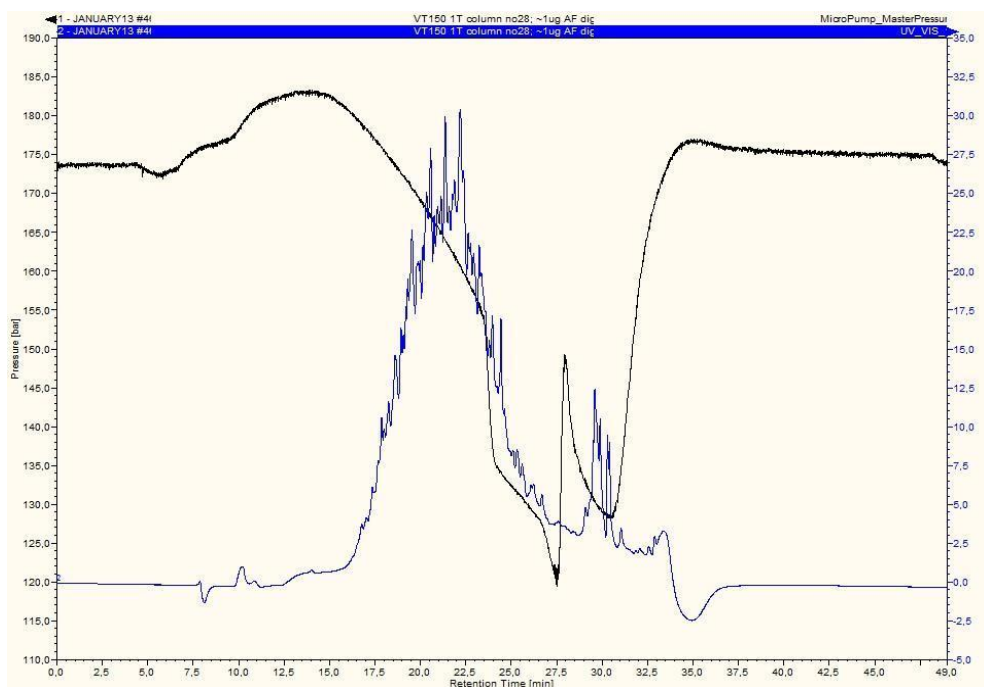


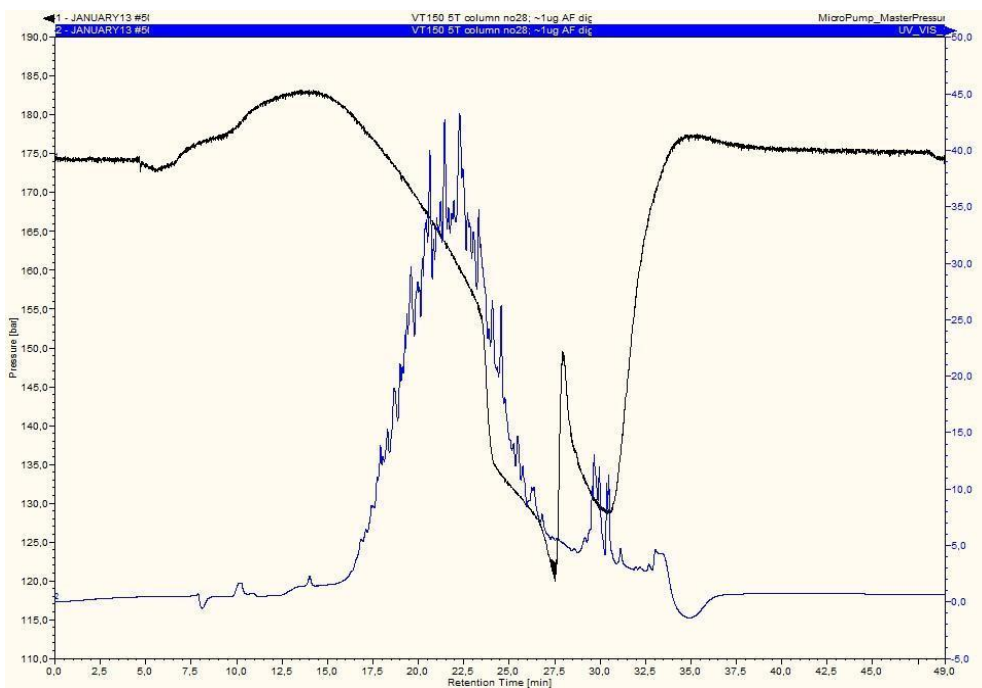
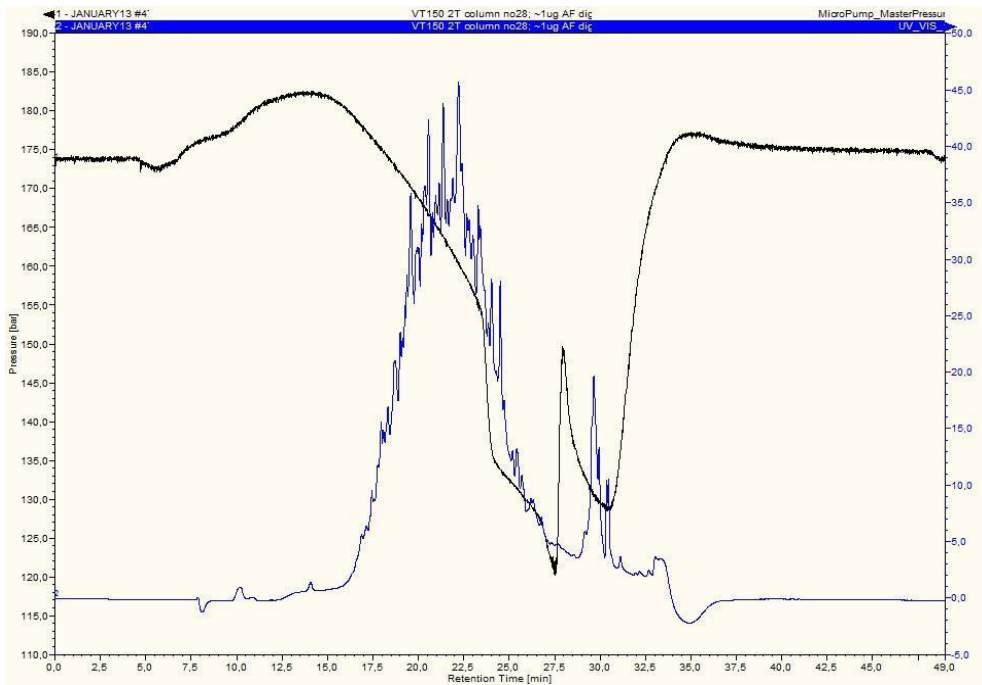
- [110] MARTNEZ -MORILLO, Eduardo, Chan-Kyung J CHO, Andrei P DRABOVICH, et al. Development of a multiplex selected reaction monitoring assay for quantification of biochemical markers of down syndrome in amniotic fluid samples. *Journal of proteome research* [online]. 2012, **11**(7), 3880–3887. ISSN 1535-3907 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1021/pr300355a
- [111] BUJOLD, Emmanuel, Roberto ROMERO, Juan Pedro KUSANOVIC, et al. Proteomic profiling of amniotic fluid in preterm labor using two-dimensional liquid separation and mass spectrometry. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians* [online]. 2008, **21**(10), 697–713. ISSN 1476-4954. Dostupné z: doi:10.1080/14767050802053289
- [112] HALLINGSTRM, Maria, Petra ZEDNKOV, Vojtěch TAMBOR, et al. Mid-trimester amniotic fluid proteomes association with spontaneous preterm delivery and gestational duration. *PloS one* [online]. 2020, **15**(5), e0232553. ISSN 1932-6203 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0232553

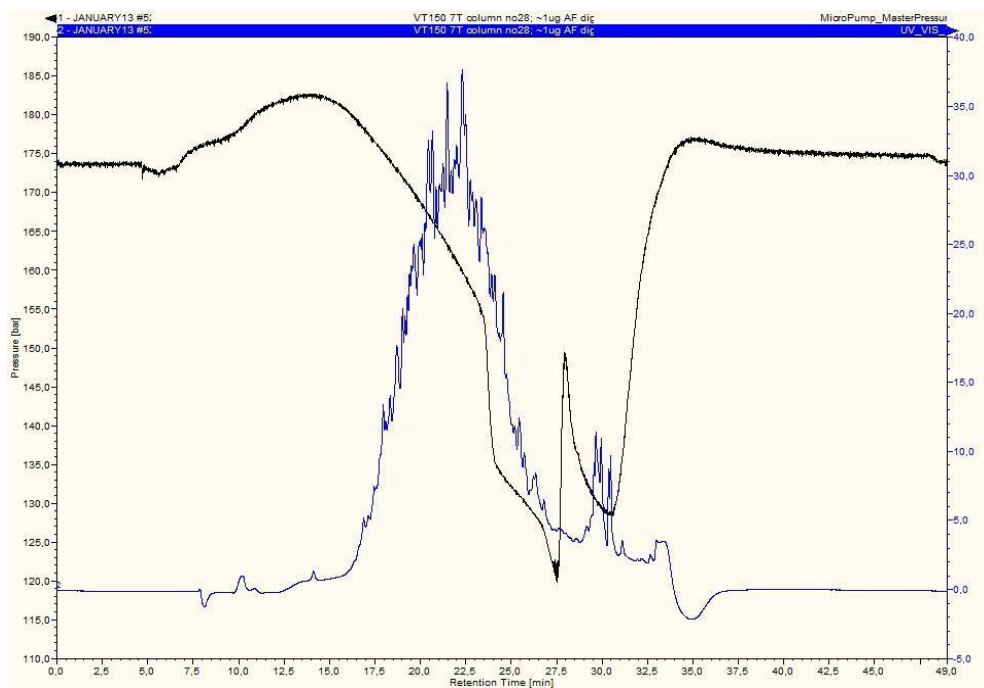
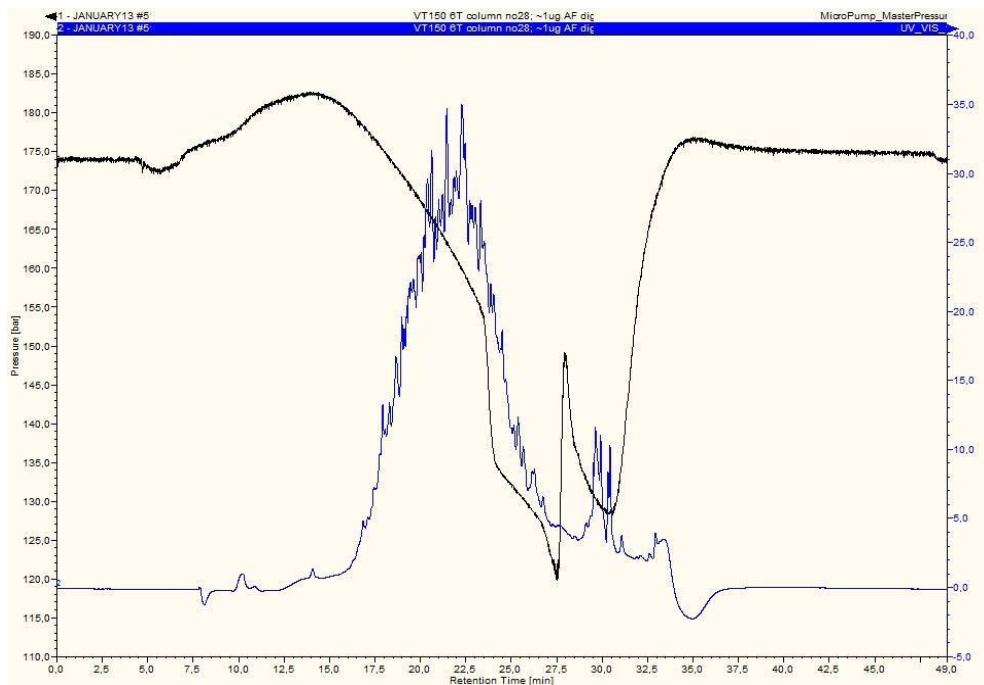
## 9. Přílohy

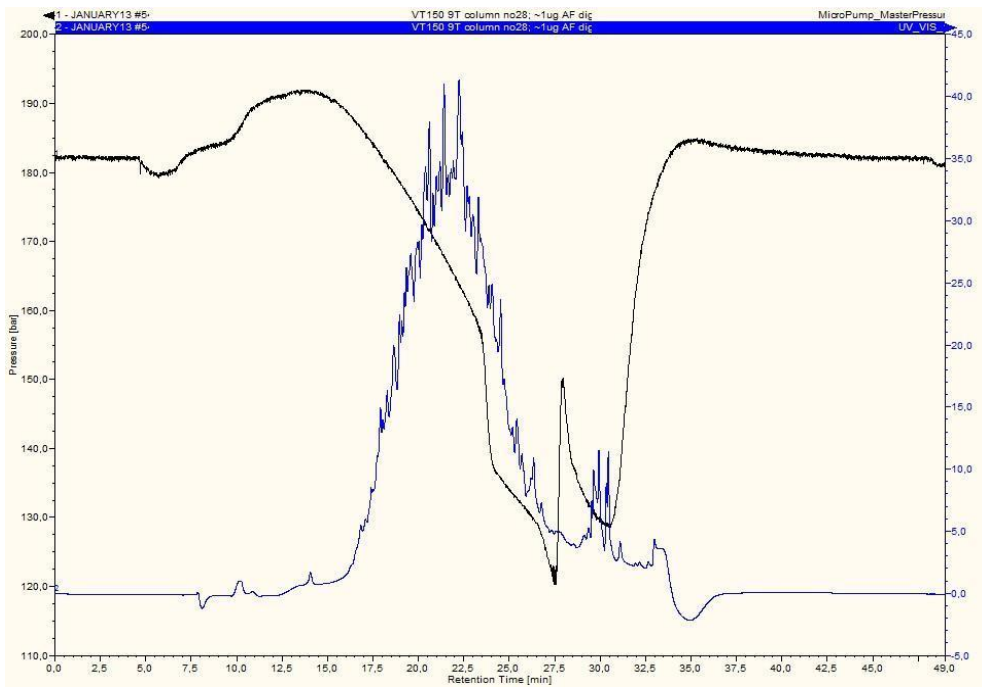
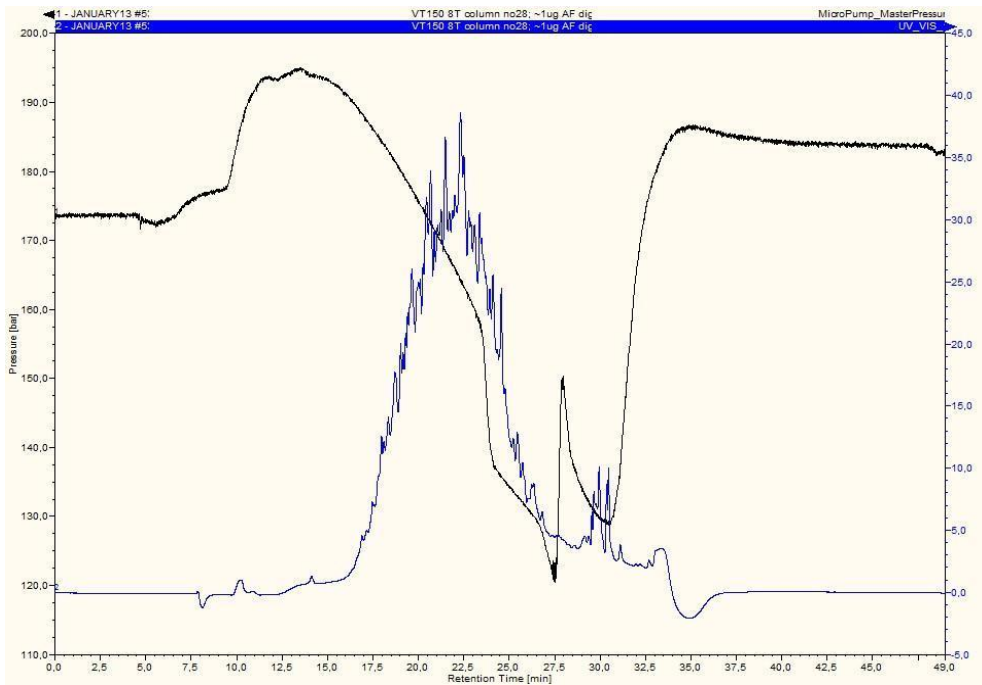
Příloha 1: Záznam z LC měření multiplexů pro kontrolu obsahu celkového množství proteinů, multiplexy 1-20 (1T-20 T)), blank.....	123
Příloha 2: Ukázka záznamu full scanu MS multiplexu 8 a 12.....	133
Příloha 3: Porovnání měření všech 3 replikátů na multiplexu 6.....	134
Příloha 4: Porovnání 3 šarží standardu CytC použitých během měření .....	134
Příloha 5: Technická chyba při měření multiplexu 11.....	135

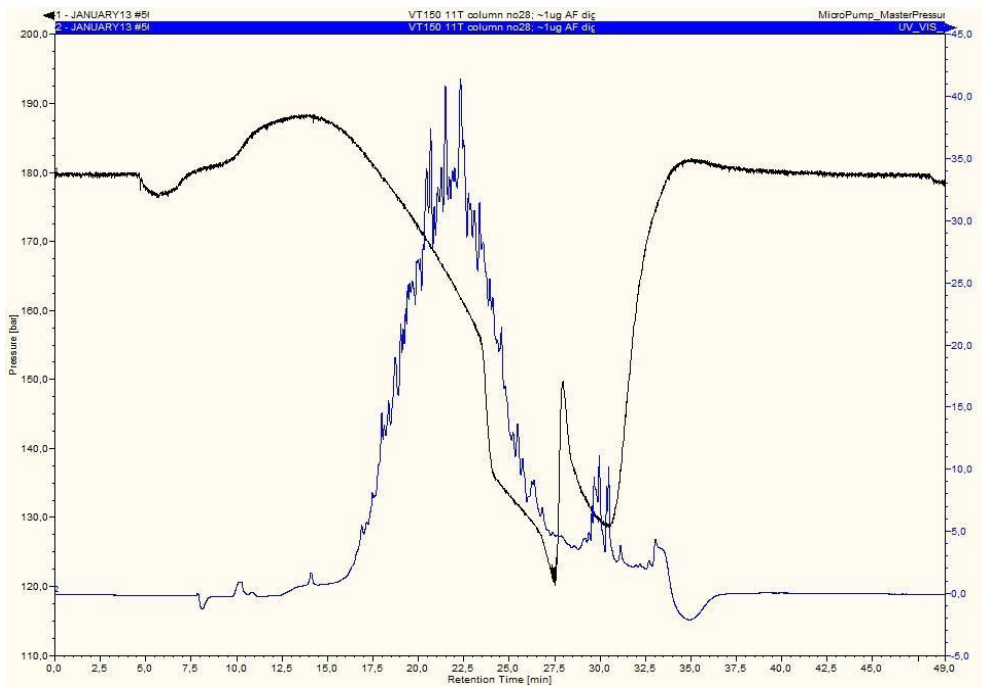
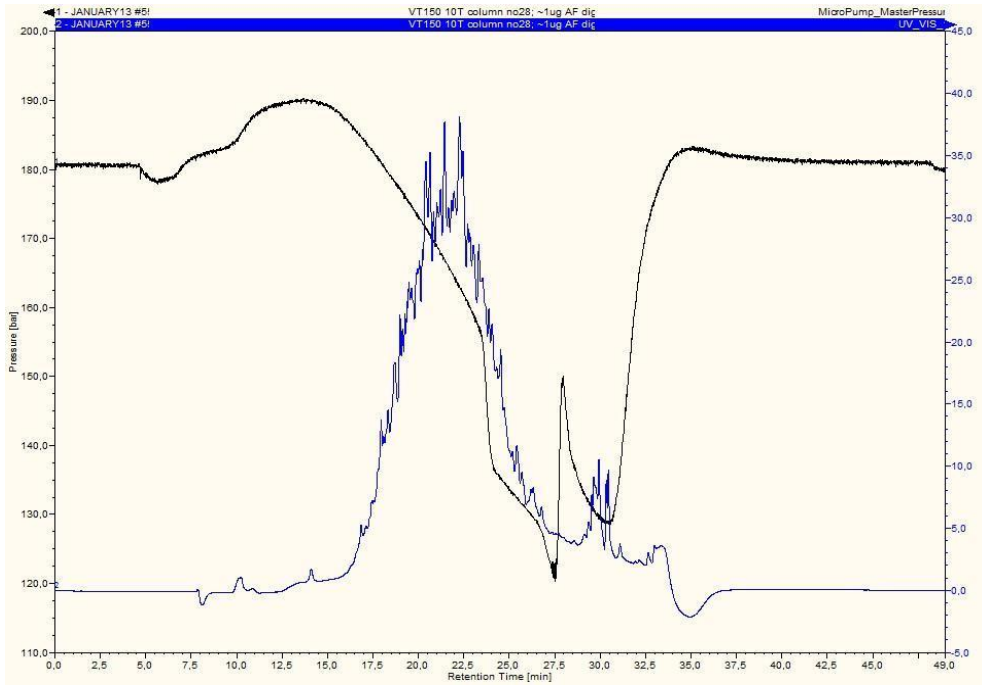
Příloha 1: Záznam z LC měření multiplexů pro kontrolu obsahu celkového množství proteinů, multiplexy 1-20 (1T-20 T), blank

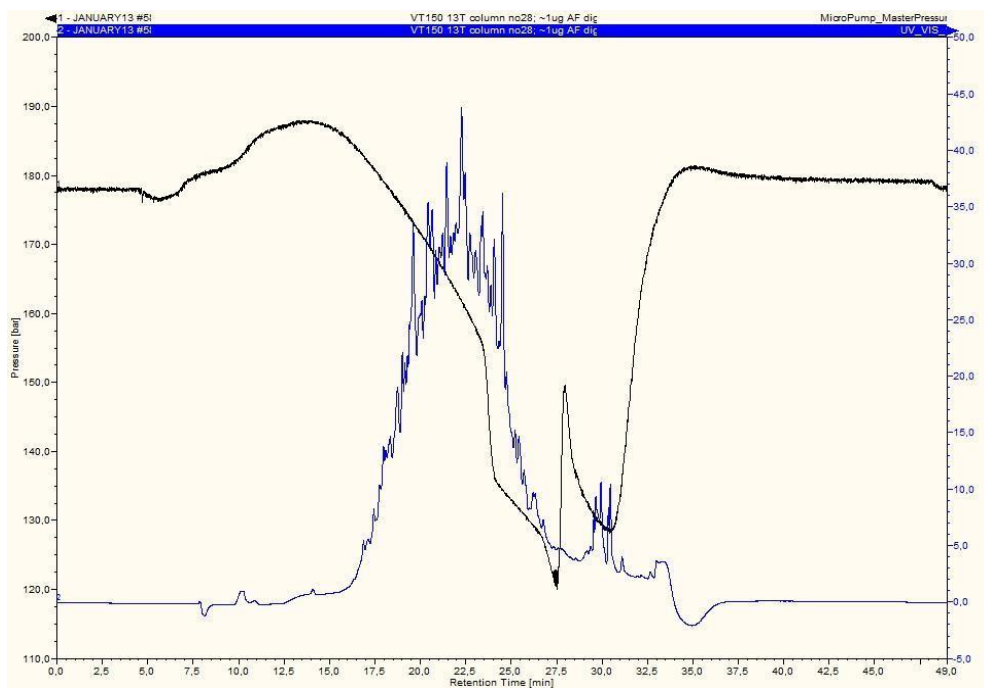
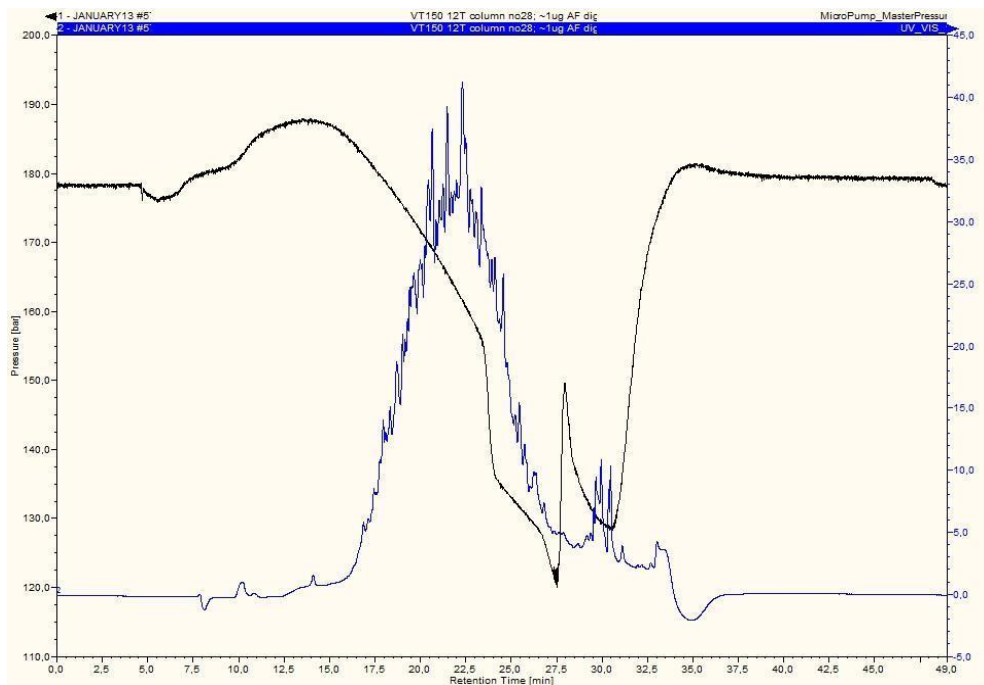




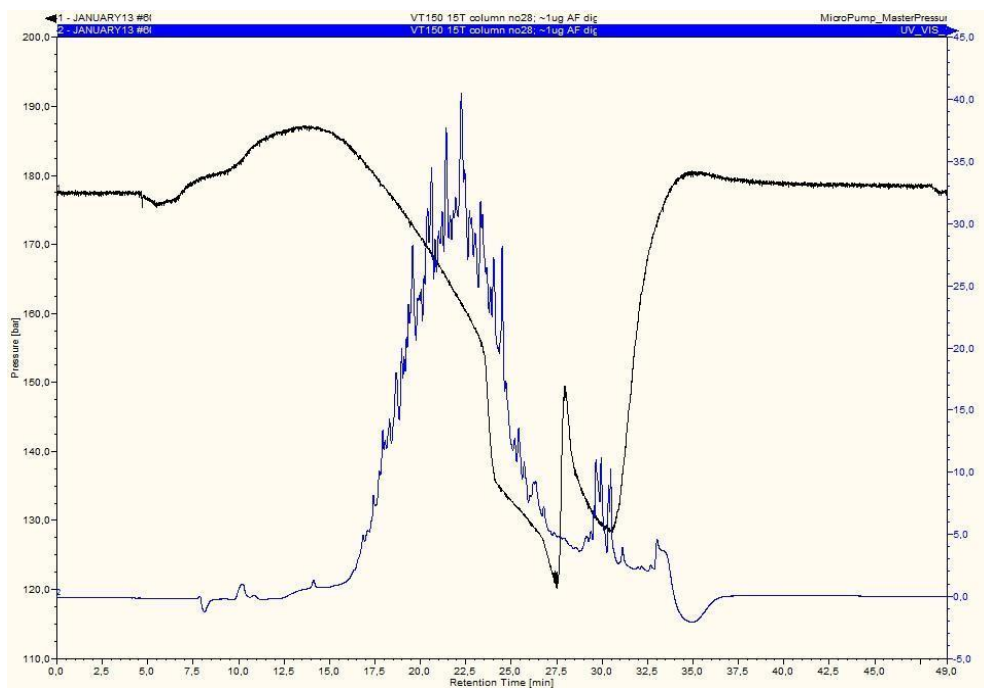
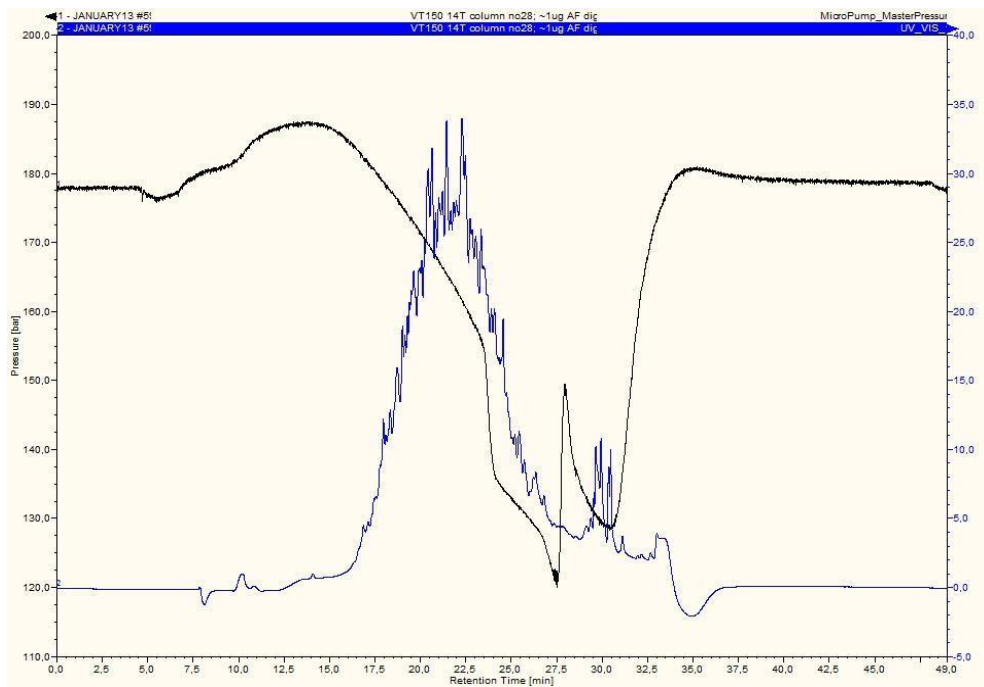


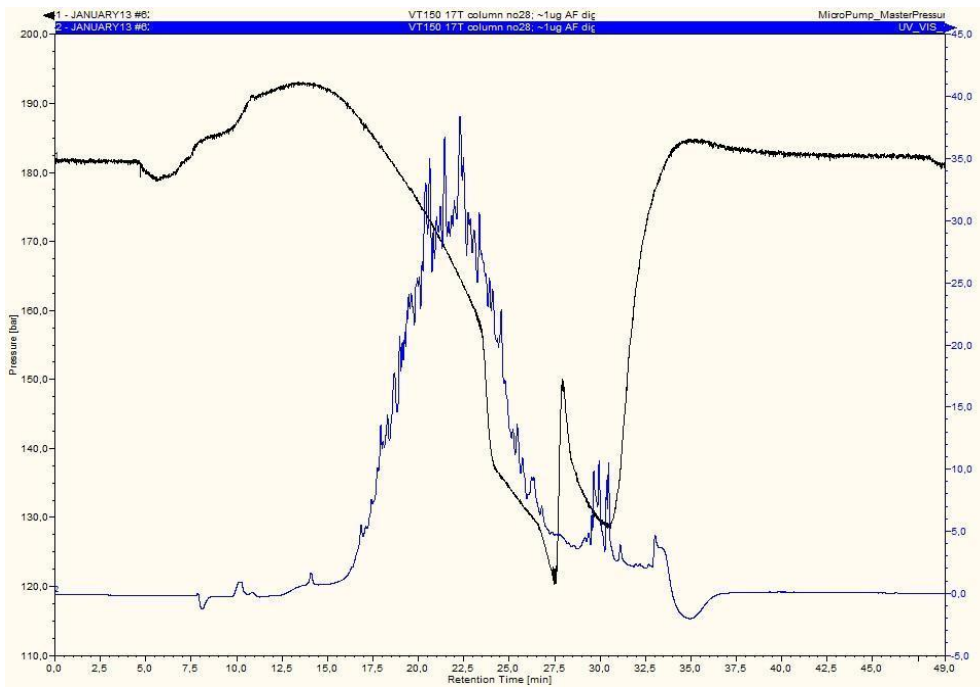
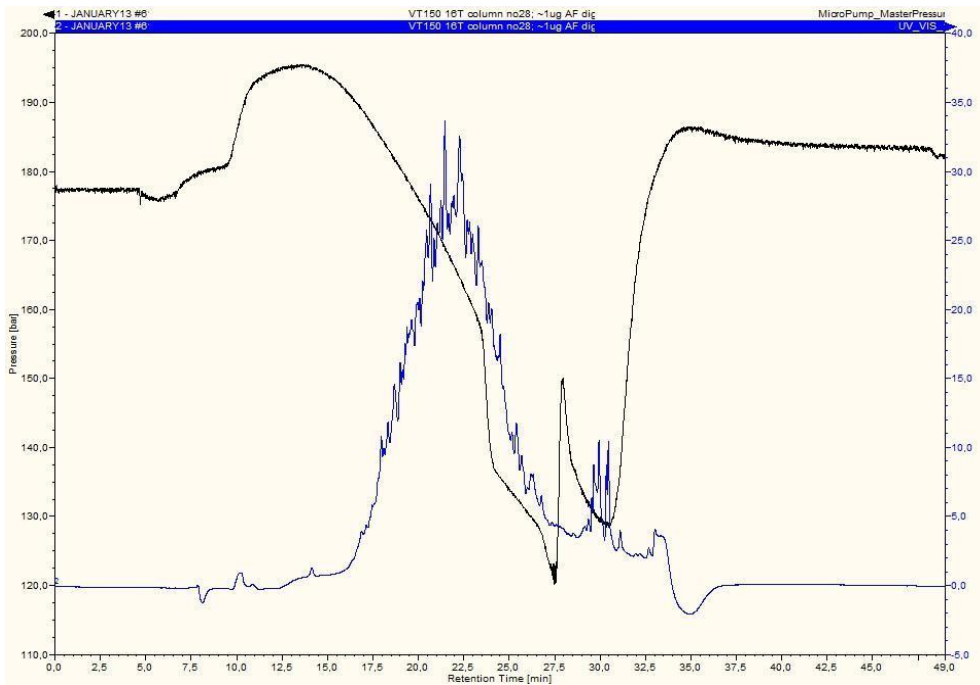


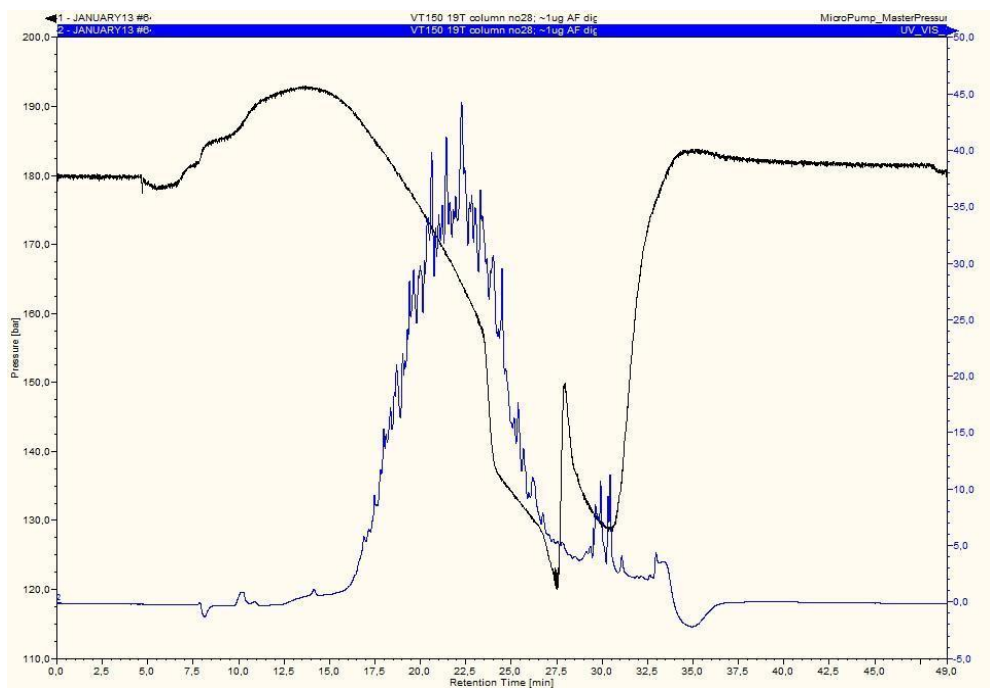
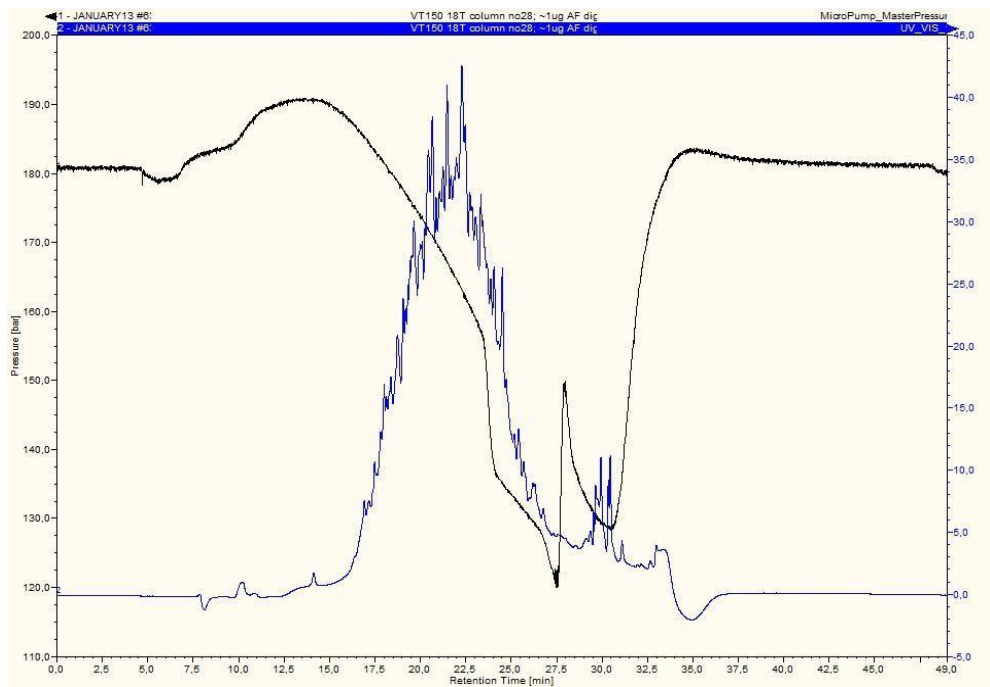


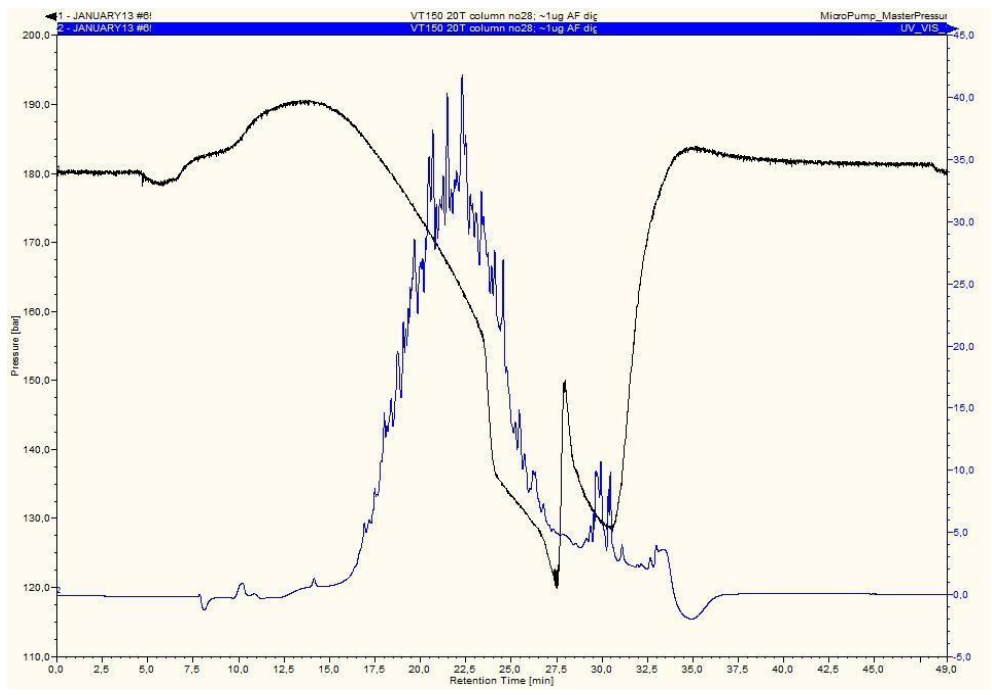




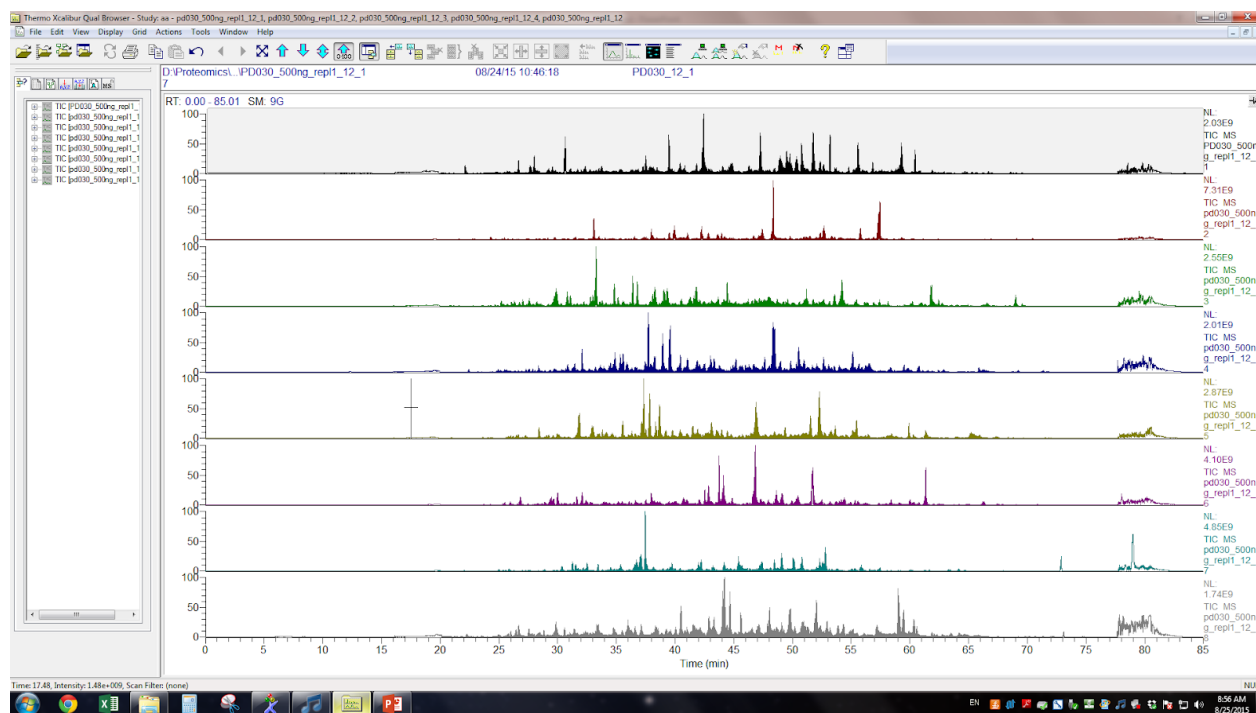
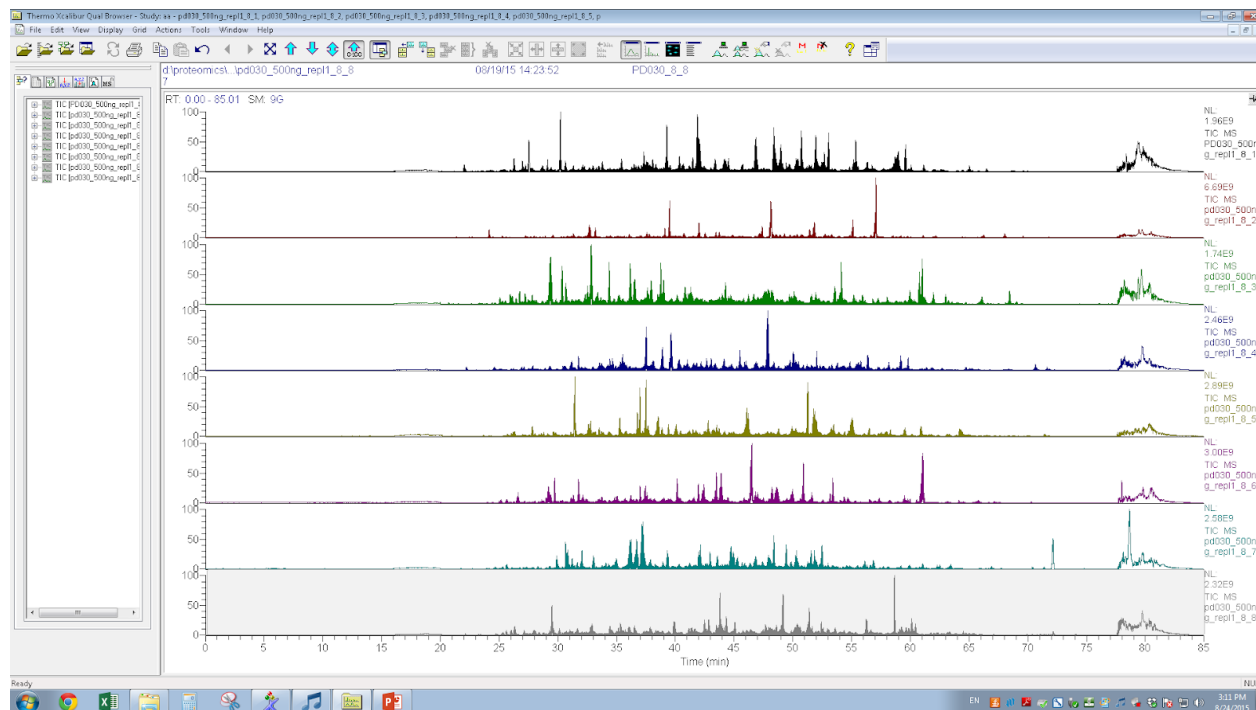




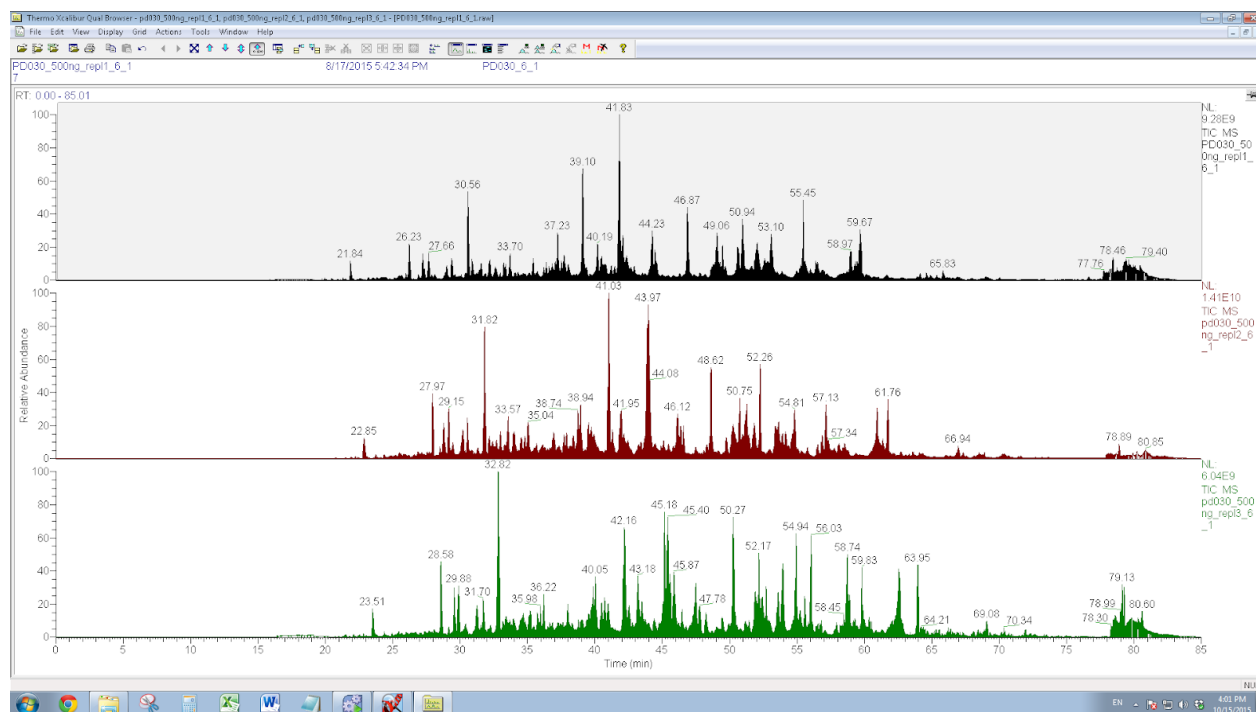




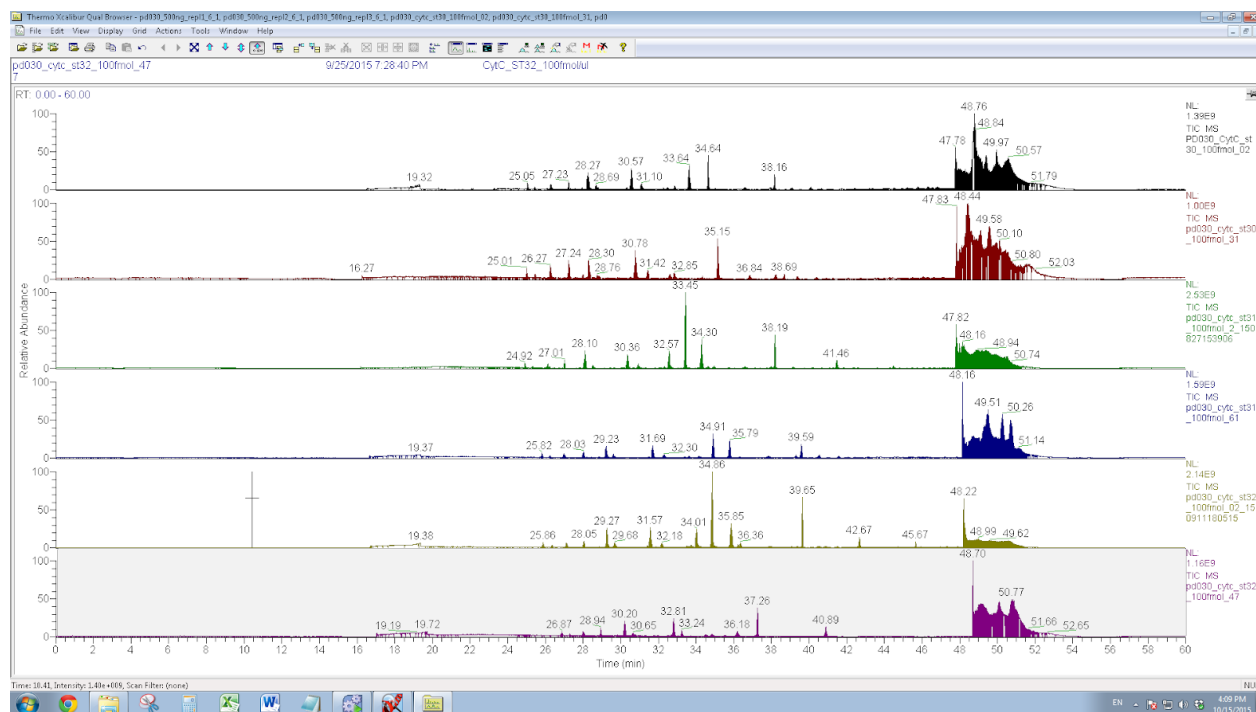
Příloha 2: Ukázka záznamu full scanu MS multiplexu 8 a 12



### Příloha 3: Porovnání měření všech 3 replikátů na multiplexu 6



### Příloha 4: Porovnání 3 šarží standardu CytC použitých během měření



Příloha 5: Technická chyba při měření multiplexu 11

