

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Příprava imunosorbentu pro specifickou izolaci biomarkerů zánětu  
Pentraxinu 3 a Interleukinu-6 z plodové vody

Diplomová práce

2021

Lucie Čiháková

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	<b>Bc. Lucie Čiháková</b>
Osobní číslo:	<b>C19581</b>
Studijní program:	<b>N0512A130006 Analýza biologických materiálů</b>
Studijní obor:	<b>Analýza biologických materiálů</b>
Téma práce:	<b>Příprava imunosorbentu pro specifickou izolaci biomarkerů zánětu Pentraxinu 3 a Interleukinu-6 z plodové vody</b>
Zadávací katedra:	<b>Katedra biologických a biochemických věd</b>

### Zásady pro vypracování

#### Teoretická část:

- 1) popis fyziologie a patofyziologie plodové vody, jejího složení a vlastností v průběhu celého těhotenství s fyziologickým průběhem. Komplikace spojené se změnou ve složení plodové vody v souvislosti s rizikem předčasného odtoku plodové vody u těhotných; diagnostické metody předčasného odtoku plodové vody
- 2) struktura a funkce proteinu PTX3 a IL-6 – souvislosti s rozvojem zánětu v lidském organismu, se zaměřením na rozvoj zánětu u gravidních žen
- 3) popis principu imunomagnetické afinitní separace, její výhody a nevýhody ve srovnání s klasickými kolonovými technikami separace proteinů. Popis vlastností magnetických materiálů, jejich chování v magnetickém poli s ohledem na využitelnost v klinické diagnostice.

#### Experimentální část:

- 1) Vytipování nejvhodnějších specifických protilátek pro přípravu imunosorbentu – základní metody pro charakterizaci proteinů – stanovení molekulové hmotnosti, ověření čistoty – elektroforetická separace proteinů (SDS-PAGE), blotovací techniky (western-blot, dot-blot) pro ověření reaktivity specifických antigenů a protilátek – vytipování reaktivního páru antigen – protilátka
- 2) příprava imunosorbentů – imobilizace IgG protilátek na magnetické částice s -COOH sk., hydrazidové sk., pomocí proteinu A/G. Vytipování nejvhodnějšího způsobu imobilizace v první fázi s modelovým systémem – nespecifické IgG, následně aplikovat pro specifické anti-PTX3 a anti-IL-6 protilátky. Ověření účinnosti imobilizace pomocí SDS-PAGE, denzitometrické vyhodnocení. Porovnání účinnosti jednotlivých způsobů vazby a testovaných magnetických nosičů.
- 3) ověření reaktivity připravených nosičů s cílovým antigenem – účinnost záchytu a eluce antigenu – ověření metodou SDS-PAGE či dot-blot.
- 4) pro nejúčinnější imunosorbent ověřit schopnost záchytu (specifitu a selektivitu) v komplexní biologické matici – sérum, případně plodová voda.

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

**Seznam doporučené literatury:**

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

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

L.S.

---

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

---

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

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 30.7. 2021

Lucie Čiháková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. a konzultantce mé diplomové práce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. za odborné profesionální vedení, pozitivní přístup, cenné rady, připomínky a pomoc při práci v laboratoři, tak i při samotném zpracování diplomové práce. Poděkování patří také mé rodině za podporu a umožnění studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce je zaměřená na tvorbu imunosorbentu pro izolaci Pentraxinu 3 ze vzorků plodové vody. Cílem práce bylo vybrat vhodný nosič magnetických částic a navázat na něj protilátky. Úspěšnost vazby protilátek a izolace antigenu byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Plodová voda, Pentraxin 3, imunoafinitní magnetická separace, imunosorbent

## **TITLE**

Preparation of immunosorbent for specific isolation of biomarkers of inflammation Pentraxin 3 and Interleukin-6 from amniotic fluid.

## **ANNOTATION**

This thesis is focused on preparation of an immunosorbent for isolation of Pentraxin 3 from amniotic fluid samples. Target of this thesis was selected a suitable carrier of magnetic particles and bind antibodies to it. The binding efficiency and isolation of antigen was verified by SDS-PAGE electrophoresis.

## **KEYWORDS**

Amniotic fluid, Pentraxin 3, immunoaffinity magnetic separation, immunosorbent

## OBSAH

ÚVOD.....	15
1. Teoretická část.....	17
1.1 Plodová voda .....	17
1.1.1 Fyziologický stav .....	17
1.2 Patofyziologie plodové vody.....	22
1.2 Infekce a Předčasný odtok plodové vody.....	24
1.2.1 Diagnostika předčasného odtoku plodové vody.....	25
1.3 Pentraxin 3.....	27
1.3.1 Superrodina pentraxinů .....	27
1.3.2 Struktura a charakterizace PTX3.....	28
1.3.3 PTX3, zánětlivé podněty a komplement .....	31
Apoptické buňky .....	34
Fibroblastový růstový faktor 2 .....	34
P-selektin .....	36
Faktor nádorové nekrózy indukovatelný proteinem genu 6.....	37
Bakterie, viry a plísňe.....	38
1.3.4 PTX3 a nádorová onemocnění .....	43
1.3.5 Role PTX3 při reparaci tkání a v procesu angiogeneze .....	46
1.4 Imunoafinitní magnetická separace .....	48
1.4.1 Princip metody .....	48
1.4.2 Imunoafinitní magnetická separace vs kolonové techniky.....	50
1.4.3 Magnetické materiály a jejich vlastnosti .....	50
Tvrdé magnetické materiály a permanentní magnety .....	51
Měkké magnetické materiály .....	52

1.4.4 Magnetické materiály v klinické diagnostice .....	52
Transport léčiv magnetickými nanočásticemi .....	53
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	55
3. EXPERIMENTÁLNÍ část .....	56
3.1 přístroje a pomůcky .....	56
3.2 používané chemikálie .....	56
3.2.1 Typy nosičů .....	58
3.2.2 Použité antigeny a jejich protilátky .....	58
3.3 Příprava roztoků .....	59
3.4 Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	62
3.4.1 Barvení gelů .....	64
3.5 Imobilizace IgG na magnetických částicích s karboxylovou funkční skupinou a s přídavkem SNHS .....	65
3.6 Vazba IgG na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou .....	65
3.7 Ověření funkčnosti připravených imunosorbentů s imobilizovanými protilátkami pomocí imunokomplexu .....	66
3.8 Vazba IgG na magnetické částice MODIFIKOVANÉ proteinem A JEJICH STABILIZACE pomocí S-NHS .....	67
3.9 oxidace protilátek NaIO <sub>4</sub> a jejich biotinylace pomocí HYDRAZID-BIOTIN .....	68
3.10 Vazba biotinylovaných protilátek IGG na magnetické částice MODIFIKOVANÉ streptavidinem.....	69
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	70
4.1 Příprava imunosorbentů s různými typy vazby s nespecifickými IgG .....	70
4.1.1 Vazba nespecifických IgG na magnetické částice s COOH funkční skupinou .....	71
4.1.2 Vazba nespecifických IgG na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou.....	72



4.1.3 Vazba nespecifických IgG na magnetické částice modifikované proteinem A a stabilizované S-NHS .....	73
4.1.4 Vazba nespecifických IgG na magnetické částice modifikované streptavidinem.....	75
4.2 Příprava imunosorbentů s různými typy vazby se specifickými anti-HEa protilátkami .....	78
4.2.1 Vazba specifických anti-HE4 protilátek na magnetické částice s COOH funkční skupinou.....	78
4.2.2 Vazba specifických anti-HE4 protilátek magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou.....	79
4.3 Vazba antigenu HE4 na imunosorbenty se specifickými anti-HE4 protilátkami .	81
4.3.1 Vazba antigenu HE4 na imunosorbent s magnetickými částicemi s COOH funkční skupinou.....	81
4.3.2 Opakovaná vazba antigenu HE4 na imunosorbent s magnetickými částicemi s COOH funkční skupinou.....	83
4.3.3 Vazba antigenu HE4 na imunosorbent s magnetickými částicemi s hydrazidovou funkční skupinou.....	84
4.3 Příprava imunosorbentu s anti-PTX3 protilátkami.....	86
4.3.1 Uvolnění nespecifických IgG z magnetických částic s modifikovaným proteinem A a stabilizovaných pomocí S-NHS .....	86
4.3.2 Vazba specifických anti-PTX3 protilátek na magnetické částice modifikované proteinem a stabilizované S-NHS.....	87
4.4 vazba PTX3 antigenu na imunosorbent a jeho následná eluce.....	90
ZÁVĚR.....	92
POUŽITÁ LITERATURA .....	93

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Objem plodové vody v závislosti na čase a délce těhotenství .....	18
Obrázek 2: Odběr plodové vody, převzato: [10] .....	19
Obrázek 3: Funkce proteinů zastoupených v plodové vodě během těhotenství [11].....	20
Obrázek 4: Schématické zobrazení pentraxinové superrodiny.....	28
Obrázek 5: 3D modelová struktura PTX3, převzato a upraveno: [59] .....	28
Obrázek 6: Lineární a oktamerová struktura PTX3, převzato [60] .....	29
Obrázek 7: Pozice disulfidických můstků v rámci oktameru struktury pentraxinu 3, převzato z [63] .....	30
Obrázek 8: Strukturní model sekundární struktury PTX3, převzato z [53].....	30
Obrázek 9: Ilustrace chování faktoru H, převzato z [72].....	32
Obrázek 10: Pentraxin 3 v komplementové kaskádě z [71] .....	33
Obrázek 11: Ligandy Pentraxinu 3 převzato a upraveno z [65] .....	34
Obrázek 12: Doména pro vazbu fibroblastového růstového faktoru na Pentraxinu 3, převzato a upraveno z [84] .....	35
Obrázek 13: Aktivace a inhibice komplexu Pentraxin 3/fibroblastický růstový faktor 2, převzato z [86] .....	36
Obrázek 14: Faktor nádorové nekrózy-indukovatelný proteinem genu 6 a jeho vazba na ligandy, převzato z [96] .....	38
Obrázek 15: Vazba Pentraxinu 3 na vybrané mikroorganismy, upraveno a převzato z [109] ..	39
Obrázek 16: Úloha Pentraxinu 3 v nádorovém bujení převzato a upraveno z [135].....	44
Obrázek 17: Základy imunoafinitní chromatografie, převzato z [152] .....	48
Obrázek 18: Typická DC hysterezní křivka, převzato z [167] .....	51
Obrázek 19: Schéma distribuce léků za pomoci vnějšího magnetického pole, převzato z [185]. .....	53
Obrázek 20: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby hIgG na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (DYNABEADS) .....	71
Obrázek 21: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby nescifických hIgG na magnetické částice HEMA 40%-co-EDMA-NHNH <sub>2</sub> .....	72
Obrázek 22: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby nescifických hIgG protilátek na magnetické částice (PureProteom <sup>TM</sup> Protein A Magnetic Beads) .....	74
Obrázek 23: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti biotinylace nescifických hIgG. ....	76

Obrázek 24: Záznam SDS-PAGE – ověření vazby biotinylovaných hIgG na magnetické částice (DYNABEADS™ MyOne™ Spreptavidin C1.).....	77
Obrázek 25: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby anti-HE4 na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (DYNABEAD).....	78
Obrázek 26: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby anti-HE4 na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (SiMAG ) .....	79
Obrázek 27: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby specifických anti-HE4 protilátek na magnetické částice SiMAG Hydrazide .....	80
Obrázek 28: Záznam SDS-PAGE – kontrola účinnosti vazby a eluce HE4 antigenu na imunosorbent s anti-HE4 protilátkami na magnetických částicích (SiMAG) .....	82
Obrázek 29: Záznam SDS-PAGE – kontrola účinnosti vazby a eluce HE4 antigenu na imunosorbent s anti-HE4 protilátkami na magnetických částicích (DYNABEADS) .....	83
Obrázek 30: Záznam SDS-PAGE – Kontrola účinnosti druhé vazby a eluce HE4 antigenu na imunosorbent s anti-HE4 protilátkami na magnetických částicích (DYNABEADS) .....	84
Obrázek 31: Kontrola vazby a eluce HE4 antigenu na imunosorbent s anti-HE4 na SiMAG Hydrazide .....	85
Obrázek 32: Záznam SDS-PAGE – Eluce hIgG z imunosorbentu s proteinem A .....	86
Obrázek 33: Záznam SDS-PAGE –kontrola účinnosti vazby monoklonálních PTX3 protilátek (M01; clone 5B7) na PureProteom™ Protein A™ Magnetic Beads .....	87
Obrázek 34: Záznam SDS-PAGE – kontrola vazby polyklonálních králičích protilátek anti-PTX3 (LS-C804485) na PureProteom™ Protein A™ Magnetic Beads.....	88
Obrázek 35: Kontrola vazby a eluce antigenu PTX3 na imunosorbent.....	91
Tabulka 1: Přehled vybraných látek obsažených v plodové vodě .....	21
Tabulka 2: Přehled neinvazivních testů používaných k diagnóze PROM, Převzato a upraveno: [52].....	26
Tabulka 3: Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE .....	63
Tabulka 4: Popis vazeb protilátek na protein A, převzato a upraveno [193].....	73

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AFI	Index plodové vody (z angl. „Amniotic Fluid Index“)
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
C1q	Komplementová část 1q (z angl. „Complement component 1q“)
C4S	Chondroitin-4-sulfát (z angl. „Chondroitin-4-Sulphate“)
CMV	Cytomegalovirus
CNS	Centrální nervová soustava
CRI	S nádory asociovaný zánět (z angl. „Cancer-Related Inflammation“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermální růstový faktor (z angl. „Epidermal Growth Factor“)
ELISA	Enzymová imunisorbentní analýza (z angl. „Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay“)
FGF	Fibroblastový růstový faktor (z angl. „Fibroblast Growth Factor“)
FGF-2	Fibroblastový růstový faktor 2 (z angl. „Fibroblast Growth Factor 2“)
FGF8b	Fibroblastový růstový faktor 8b (z angl. „Fibroblast Growth Factor 8b“)
FGFR	Receptor fibroblastového růstového faktoru (z angl. „Fibroblast Growth Factor Receptor“)
FH	Faktor H
HA	Hyaluroan
HNSCC	Spinocelulární karcinom hlavy a krku (z angl. „Head and Neck Squamous Cell Carcinoma“)
HSPG	Heparansulfát proteoglykan (z angl. „Heparan Sulfate ProteoGlykan“)
IAI	Intra-amnionická infekce/zánět (z angl. „Intra-amniotic Inflammation/Infection“)

IGFBP-1	Protein vázající růstový faktor podobný inzulinu 1 (z angl. „Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1“)
IL-6	Interleukin-6
IUGR	Intrauterinní omezení růstu plodu (z angl. „Intrauterine Growth Restriction“)
MBL	Lektin vázající manózu (z angl. „Mannose Binding Lectin“)
MD-2	Myeloidní diferenační faktor 2 (z angl. „Myeloid Differentiation factor 2“)
MIAC	Mikrobiální invaze plodové vody (z angl. „Microbial Invasion of the Amniotic Cavity“)
mNMR	Miniaturizovaná verze přístroje nukleární magnetické rezonance
NF- $\kappa$ B	Nukleární faktor $\kappa$ B (z angl. „Nuclear Factor $\kappa$ B“)
Ox-LDL	Oxidované lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. „Oxidised Low Density Lipoproteins“)
PAMG-1	Placentární $\alpha$ -mikroglobulin 1 (z angl. „Placental $\alpha$ -MicroGlobulin 1“)
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza (z angl. „PhosphoInositide 3-Kinase“)
Pkt	Proteinkináza B (z angl. „Protein kinase B“)
Plg	Plasminogen
POCT	Testování u lůžka pacienta (z angl. „Point Of Care Test“)
PROM	Předčasný odtok plodové vody (z angl. „Preterm Rupture of Membranes“)
PRRs	Receptory rozpoznávající molekulové vzory (z angl. „Pattern Recognition Receptor“)
PSGL-1	Glykoproteinový ligand P-selektinu-1 (z angl. „P-Selectin Glycoprotein Ligand-1“)
PTX3	Pentraxin 3
RANKL	Ligand aktivačního receptoru nukleárního faktoru kappa-B (z angl. „Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand“)
ROC	Charakteristika operačního přijímače (z angl. „Receiver Operating“)

	Characteristic“)
SDP	Sloupec plodové vody (z angl. „Single Deepest Pocket)
shRNA	Krátká vlásenková RNA (z angl. „Short Hairpin RNA“)
SMC	Strukturní chromozomální kontrola (z angl. „Structural Maintenance of Chromosomes)
S-NHS	Sulfo-N-hydroxysukcinimid
TFA	Trifluorová kyselina (z angl. „trifluor acid“)
TLR	Toll-like receptor (z angl. „Toll Like Receptor“)
TSG-14	Faktor nádorové nekrózy indukovatelný proteinem genu 14 (z angl. „Tumor Necrosis Factor-inducible Gene 14 protein“)
TSG-6	Faktor nádorové nekrózy indukovatelný proteinem genu 6 (z angl. „Tumor Necrosis Factor-inducible Gene 6 protein“)
β2-GPI	β2-glykoprotein I (z angl. „β2-Glycoprotein I“)

## ÚVOD

Během těhotenství se mění složení a objem plodové vody. Tyto změny mohou sloužit k predikci různých onemocnění. Jedním z nejčastěji zkoumaných problémů je předčasný porod a předčasný odtok plodové vody. Během porušení plodových membrán může dojít k infekci plodové vody a ohrožení života matky či plodu. K porušení plodových obalů může dojít zanesením infekce do dělohy. Některé mikrobiální kmeny jsou schopné rozrušit stěny plodových obalů. Nejčastěji se jedná o infekce z urogenitálního traktu.

Při podezření na předčasný odtok plodové vody je žena odvezena do nemocnice, kde se udělá řada vyšetření. Po předčasném odtoku plodové vody je nutné zjistit, zda se u matky nerozvíjí infekce, která by ji a plod mohla ohrozit na životě. Základní složkou pro tato vyšetření je plodová voda. K získání plodové vody se nejčastěji používá aminocentéza. Jedná se o invazivní zákrok, při kterém se plodová voda odebere přímo z dělohy. Pokud je infekce prokázána, např. zvýšenou hladinou interleukinu-6 nebo pentraxinu 3, musí lékař dítě co nejdříve porodit. Pro co nejrychlejší určení zánětlivých parametrů v plodové vodě a včasné záchraně matky i dítěte, je vyvíjen test, který by splňoval POCT parametry. Takovýto test by umožňoval provádět analýzu plodové vody vedle lůžka pacienta. Test přímo u lůžka by snížil dobu potřebnou pro provedení analýzy, např. čas nutný k přenesení vzorku do laboratoře. Jednoduchost testu by také umožňovala, aby ho mohl provádět proškolený zdravotnický personál. Nebyl by k tomu nutný pracovník ze zdravotnických laboratoří.

Existuje několik proteinů, které slouží jako identifikační znaky pro předčasný odtok plodové vody nebo infekci plodové vody. Jedním z těchto studovaných proteinů je Pentraxin 3. Tento protein se účastní zánětlivých stavů v těle a vyskytuje se tak i v plodové vodě. Jeho hodnoty v plodové vodě korelují se závažností onemocnění. Jeho produkce se zvýší při poškození plodových obalů.

Jedna zvýšená hodnota zánětlivého proteinu však nemusí znamenat, že se jedná o infekci. Pro její prokázání se musí potvrdit přítomnost více proteinů. V našem testu by se mělo jednat o interleukin-6, Pentraxin 3 a kalretikulin. Jedná se o zánětlivé proteiny. Jejich produkce se zvýší v přítomnosti zánětu. Přímo by se jednalo o imunosenzor, který by byl schopen vyvázat požadované proteiny ze vzorku plodové vody.

Imunosenzor bude mít podobu tištěné elektrody. Pro co nejlepší specifitu a senzitivitu připravovaného imunosenzoru se využívá ROC křivka. Podle jejího tvaru a strmosti lze určit, který z parametrů je nutné optimalizovat.



# 1. TEORETICKÁ ČÁST

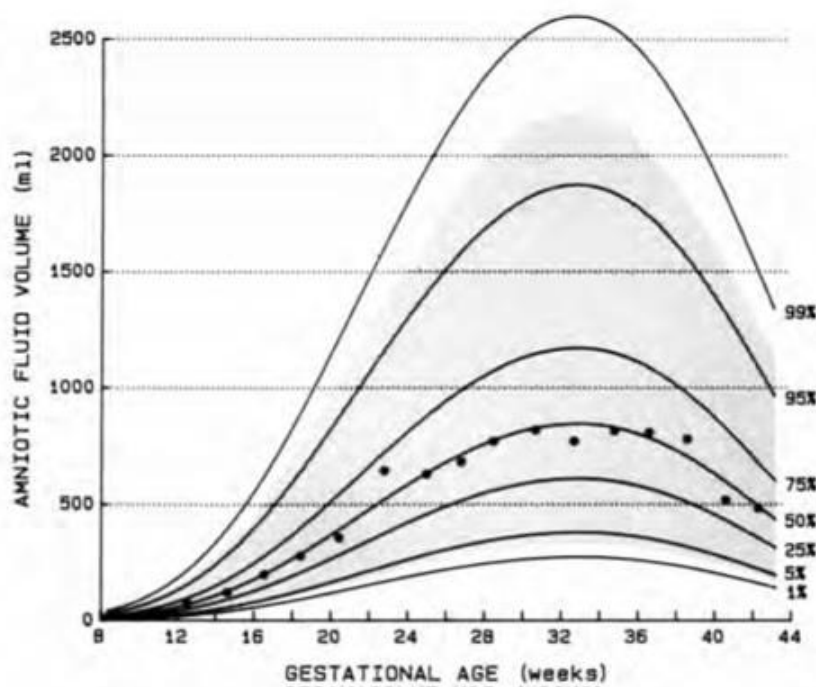
## 1.1 PLODOVÁ VODA

Během těhotenství se v děložní dutině kolem plodu tvoří tekutina, kterou nazýváme plodová voda. Její nejdůležitější funkcí je zajišťovat ochranu plodu. Protože se plodová voda nachází v přímém kontaktu s plodem, lze z ní získat údaje o jeho zdravotním stavu.

### 1.1.1 Fyziologický stav

Plodová voda obklopuje plod v těle matky. Její složení a celkový objem se během celého těhotenství mění v odpověď na zdravotní stav matky a plodu [1]. Na začátku gestace je její objem několikanásobně větší v poměru k velikosti plodu, což mu zaručuje možnost pohybu. Ve fyziologických těhotenstvích objem plodové vody rovnoměrně stoupá od prvního trimestru až do období 33. týdne těhotenství. Následně objem plodové vody klesá a v období porodu její objem činí něco okolo 700-800 ml [2]. Níže na Obrázku 1. je vidět měnící se objem plodové vody během celého těhotenství [3]. V pátém měsíci nastává fyziologický polyhydramnion, v němž dojde k nárůstu plodové vody až k 2000 ml. Objem plodové vody v poměru k velikosti plodu je největší za celé těhotenství. Plodová voda se tvoří z matčiny plazmy, epiteliálního sekretu plic [4], epiteliálního sekretu trávicího ústrojí plodu [5], z pupečníku a později i fungujících ledvin plodu [6].

Pro změření objemu plodové vody se využívají různé klinické metody. První z nich je zobrazovací metoda sonografie např. pro určení indexu plodové vody (AFI), nebo pro určení výšky sloupce plodové vody (SDP) [5].

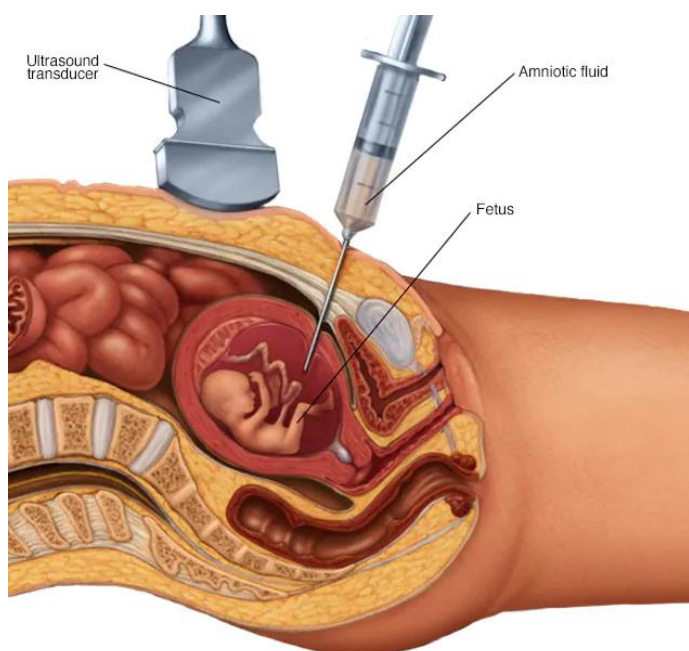


Obrázek 1: Objem plodové vody v závislosti na čase a délce těhotenství

*Tečky v grafu zobrazují dvoutýdenní intervaly měření objemu plodové vody. Percentily jsou spočítány polynomiální regresi a zbytkovou směrodatnou odchylkou. Vystínovaná oblast překrývá 95 % intervalů spolehlivosti. Převzato a upraveno [3].*

Fyziologická plodová voda je lehce zakalená kapalina. Má mírně vyšší viskozitu a hustotu než voda a bod tuhnutí má lehce pod bodem tuhnutí vody [7].

Získání vzorku plodové vody se provádí aminocentézou. Jedná se o nejběžnější invazní test používaný v prenatalní diagnostice [8]. Během aminocentézy se jehla zavádí do těla těhotné ženy. Pomocí ultrazvuku se vybírá místo, kde je největší vertikální kapsa plodové vody. Pokud je to možné, tak se během odběru jehla vyhne placentě, pokud tak nelze učinit, vybírá se pro vpich nejtenčí místo placenty. Celý zákrok je pak kontrolován pomocí ultrazvuku [9]. Odběr plodové vody je znázorněn na Obrázku 2.



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

Obrázek 2: Odběr plodové vody, převzato: [10]

### 1.1.1.1 Složení plodové vody

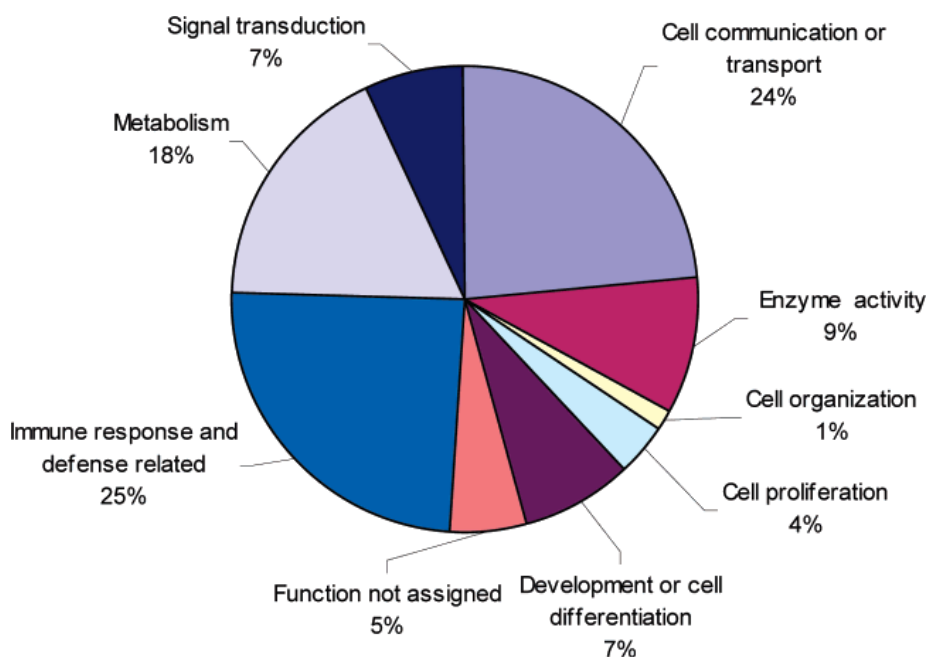
Plodová voda se skládá z 98-99 % z vody a z fyzikálně chemického hlediska se jedná o heterogenní systém, který kromě rozpuštěných látek obsahuje i buňky plodu. Rozpustnou část tvoří organické a anorganické sloučeniny [4].

Anorganická část je tvořena extracelulární kapalinou, která obsahuje ve významnějších koncentracích sodík, chloridy a oxid uhličitý. Minoritními prvky pak jsou draslík, vápník, hořčík a fosfáty [6, 7]. V rámci organických látek převažují proteiny, dále glukosa, močovina, kreatinin, lipidy, aminokyseliny, elektrolyty, mázek a chloupky lanuga [4].

Proteiny obsažené v plodové vodě jsou nejčastěji produktem amniových a choriových buněk. Proteiny mají různé funkce, což je zobrazeno na Obrázku 3 [11]. Hodnoty proteinů se zvyšují do třicátého týdne těhotenství. Po třicátém týdnu začnou hodnoty proteinů klesat. Stanovení proteinů v plodové vodě se provádí různými metodami. Nejprve se centrifugací odstředí plodová voda a k dalšímu stanovení se použije odstředěný supernatant. Proteiny se následně stanovují diskovou elektroforézou nebo radiální imunodifuzí [12].

Buňky obsažené v plodové vodě se podílejí na utváření plodu a lze je získat centrifugací plodové vody. Patří tam např. progenitorové buňky, adipocyty, osteocyty, endoteliální buňky a další [13].

Změny v plodové vodě, lze nejlépe zaznamenat pozorováním metabolomu, což je souhrn všech látek vzniklých jako produkty metabolismu matky a plodu. Metabolické změny ukazují i na případné patofyziologie. Ke sledování metabolomu plodové vody se používá nukleární magnetická rezonanční spektrometrie [14]. Močovina, kreatinin a kyselina močová během těhotenství reflektují funkci ledvin plodu. Proto se během postupujícího těhotenství jejich koncentrace zvyšují. Koncentrace aminokyselin a elektrolytů v plodové vodě jsou stejné jako koncentrace aminokyselin a elektrolytů v plazmě matky. Během gestace se v plodové vodě zvyšuje hladina lipidů u donošeného plodu až na 400 mg/l. Hodnoty sacharidů svou koncentrací odpovídají polovičním hodnotám sacharidů v plazmě matky [7,15].



Obrázek 3 Funkce proteinů zastoupených v plodové vodě během těhotenství [11]

V uvedené Tabulce č. 1 je stručný přehled látek obsažených v plodové vodě.

Tabulka 1: Přehled vybraných látek obsažených v plodové vodě

	Koncentrační rozmezí látky/100 ml plodové vody	Období gravidity	Metoda stanovení	Převzato a upraveno
Albumin	398 ± 7,41 mg	1-13 týden	Elektroforetická separace, Biuretova metoda	[16, 17]
α-1-globulin	6,78 ± 4,56 mg	1-13 týden	Elektroforetická separace, Biuretova metoda	[17]
α-Fetoprotein	550 ng/ml	27-40 týden	neuveдено	[16, 18]
Alkalická fosfatáza (EC 3.1.3.1)	20 U/l	35-37 týden	neuveдено	[19]
Betaglobuliny	40,5 ± 3,42 mg	1-13 týden	Elektroforetická separace, Biuretova metoda	[17]
Dehydrogenáza kyseliny mléčné (EC 1.1.1.27)	135 U/l	35-37 týden	neuveдено	[19]
Estradiol	1,2-3,0 ng/ml	12 týden	neuveдено	[20]
Estriol	86-145 ng/ml 559-881 ng/ml	Před 33. týdnem V termínu	neuveдено	[20]
Estron	2,5-4,4 ng/ml	12 týden	neuveдено	[20]
Fibronectin	67 ± 9 µg/ml	14-26 týden	Inhibiční radioimunoanalýza	[16]
Gammaglobulin	2,45 ± 2,85 mg	1-13 týden	Elektroforetická separace, Biuretova metoda	[17]
Glukosa	24 ± 11 mg/dl	38,5 ± 0,9 týden	Modifikace spojené enzymatické metody dle Sleina	[21]
IgG	41 ± 44 mg ± směrodatná odchylka	16-20 týden	Radiální imunodifuze	[22]

IgM	0,3 ± 0,4 mg ± směrodatná odchylka	16-20 týden	Hemaglutinační test	[22]
Kreatinin	1,3-2,78 mg	Zvyšuje se po celou délku těhotenství	Jaffova reakce	[23, 24]
Kreatinkináza (EC 2.7.3.2)	6 U/I	38-40 týden	neuveдено	[19]
Kyselá fosfatáza (EC 3.1.3.2)	3 U/I	38-40 týden	neuveдено	[19]
Lidský růstový hormon	10ng 30ng/ml	20 týden V termínu	neuveдено	[20]
Močová kyselina	8,5 mg	38 týden	neuveдено	[23]
Močovina	12,0-25,2 mg	Nárůst po celou délku těhotenství	neuveдено	[24]
Progesteron	55 ng/ml 26 ng/ml	14 týden V termínu	Test pro vazbu bílkovin	[20]
Prolactin	2,3 µg/ml	20 týden	Radioimunoanalýza	[21, 26, 27]
Prolaktin	10,000 ng/ml	1-13 týden	neuveдено	[20]

## 1.2 Patofyziologie plodové vody

Nejčastějším znakem patofyziologie plodové vody je změna celkového objemu. Na konci fyziologického těhotenství (40. týden) činí její objem něco okolo 1000 ml. Voda je kontinuálně tvořena po celou dobu gestace. Její objem se může měnit, jak ji plod polyká či následně vylučuje močí. Díky tomu lze určit některé možné příčiny změny objemu plodové vody [28].

Změny ve složení plodové vody může vyvolat i špatný zdravotní stav matky, např. infekce z urogenitálního traktu. Tato infekce může vést až k předčasnému odtoku plodové vody.

### **1.2.1 Polyhydramnion**

Termínem polyhydramnion označujeme nadměrné množství plodové vody. Obvykle je to projev narušení vývoje plodu. Během polyhydramnionu překročí objem plodové vody hranici 2000 ml. Ve více než polovině případů bývá polyhydramnion idiopatický a vede k porodu zdravého dítěte [29]. V případě, že se jedná o vážný polyhydramnion jsou anomálie plodu přítomny až u 91 % případů. U mírného polyhydramnionu tato hodnota klesne až k 17 %. Příčinou polyhydramnionu mohou být fetální malformace a genetické anomálie, matčin diabetes mellitus, mnohočetné těhotenství, fetální anémie nebo jiné příčiny, jako virová infekce, nervosvalová porucha [30, 31], nebo bakteriální infekce, např. cytomegalovirus [32].

Přítomnost polyhydramnionu se zjišťuje velikostí AFI. Když překročí 24 cm, jedná se o polyhydramnion. Měří se dvoudimenzionálním ultrazvukem [33].

### **1.2.2 Oligohydramnion**

Termínem oligohydramnion označujeme nedostatečné množství plodové vody. Jeho příčinou může být matčina vazokonstrikce, která zapříčiní menší průtok krve mezi dělohou a placentou, nebo snížená tvorba moči plodu. Může k němu dojít i odtokem plodové vody. Oligohydramnion může signalizovat komplikace v těhotenství a zvyšuje riziko fetálních malformací. Může nastat i stav, kdy plodová voda prakticky chybí, ten se pak nazývá anhydramnion [34, 35]. Pro správný vývoj plic plodu je důležitý dostatek plodové vody. Pokud plod trpí oligo- nebo anhydramnionem, nemusí dojít ke správnému vyvinutí plic. Oba případy jsou také častým jevem u vrozených vývojových vad ledvin a močových cest [36].

## 1.2 INFEKCE A PŘEDČASNÝ ODTOK PLODOVÉ VODY

Plodová voda spolu s plodovými obaly ochraňuje plod proti vnějším infekcím. Během fyziologického těhotenství dojde k porušení blan a odtoku plodové vody až v první době porodní. Za patologii se považuje odtok plodové vody před první dobou porodní. Pak se jedná o předčasný odtok plodové vody (dále jen PROM) [37]. K PROM může dojít následkem infekce plodové vody. K zanesení infekce však může dojít až po PROM. V dalších případech může PROM nastat následkem odtržení placenty, nadměrné degradaci kolagenu, lokálními defekty membrány nebo předčasně naprogramovanou smrtí buněk v plodové vodě [38].

Samotné plodové obaly jsou složeny z pěti vrstev a neobsahují cévy ani nervová zakončení. Amniotické buňky produkují kolagen typu III a IV a nekolagenní glykoproteiny, které tvoří základy plodových obalů. Stěna plodových obalů se s postupujícím těhotenstvím ztenčuje. Při vystavení plodové vody infekci, dochází ke zvýšené aktivitě matrixové metaloproteázy. Dojde k degradaci extracelulární matrix a narušení plodového obalu. K degradaci fibrilární kolagenové sítě dochází v místě s výraznými morfologickými změnami. Pro tuto oblast je charakteristický otok a narušená fibrilární síť v kompaktních, fibroblastových a houbovitých vrstvách stěny obalu. Tyto změny se neprojeví v celé zóně praskliny, ale můžou naznačovat místo začínající ruptury [39].

K infekci plodové vody dochází nejčastěji bakteriálními kmeny: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma. Hominis* [40], *Bakteroides fragilis* a *Fusobacterium sp.*[41] *Lactobacillus sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *G. Vaginalis* [42]. Všechny kmeny se vyskytují v urogenitálním traktu ženy. Předpokládá se, že infekce postupuje z urogenitálního traktu směrem k děloze a proniká přes placentární bariéru. K postupu infekce může dojít díky předčasné cervikální dilataci. Plodové obaly jsou vystaveny infekci z dolního urogenitálního traktu ženy [41].

Hlen děložního krčku tvoří hlenovou zátku, která zabraňuje proniknutí bakteriální infekce do amniové dutiny. Hlen je složen hlavně z mucinů, které tvoří základ hlenové zátky. Muciny jsou produkovány sekrečními buňkami děložního krčku. Muciny fungují jako ligandy a vážou na sebe různé biologicky důležité molekuly, např. cytokiny nebo zbytky kyseliny sialové [43]. Proteinová část mucinu obsahuje opakující se domény, bohaté na serinové a threoninové zbytky. Zbytky jsou navázány přes O-glykosidickou vazbu k uhlovodíkům včetně kyseliny sialové a N-acetylglykosylaminu [44]. Svou strukturou muciny fungují, jako molekulové síto. Záchytem bakterií tak zabraňují infekci z dolního urogenitálního traktu [43].



Další obranným mechanismem je řada antibakteriálních proteinů vyskytujících se v hlenové zátce, např. lysozym, laktoferin, kalprotein [45].

Přes tuto bariéru se dokáží dostat bakterie produkující mucinázy. Enzymovým rozkladem hlenu se zvyšují jejich virulence. Sialidázy, známé i jako neuroaminidázy [46] patří k těm významnějším enzymům. Odstraňují koncové zbytky kyseliny sialové v různých sialoglykokonjugovaných uhlovodíkových řetězcích. Odstranění zbytků kyseliny sialové vede ke ztrátě negativního náboje proteinu, což může vést ke snížení elasticity a viskozity hlenu [47].

Infekce plodové vody je také úzce spojena se zánětem plodu [38]. Infekce se může přenášet přes placentu, krví, zpětným šířením z peritoneální dutiny vejcovody, nebo iatrogenním zanesením infekce při aminocentéze, nebo kordocentéze [48].

### **1.2.1 Diagnostika předčasného odtoku plodové vody**

V určení PROM u těhotné ženy hraje roli několik faktorů. Vyšetření lékařem, celkový zdravotní stav a jednoduché testování. Pro diagnostiku PROM se používají různé testy. Kombinace nitrazinového a ferningového testu má při diagnostice PROM největší úspěšnost [38]. Dalším testem pro diagnostiku PROM je klinické vyšetření, zkouška Temešváryho činidlem, stanovení pH, ultrazvukové vyšetření, Inlab proužek PROM a další [49]. Některé ze základních testů pro určení PROM jsou popsány níže. Kromě těchto testů je také důležité kultivační vyšetření (stěr z děložního hrdla, nebo pochvy), stanovení počtu leukocytů, CPR a vyšetření plodové vody na přítomnost bakterií [15]. V posledních letech se vyvíjejí další metody pro určení PROM, jednou z nich je například určení biomarkerů proteomickou analýzou plodové vody [50].

Test Temešváryho činidlem je založen na barevném přechodu bromthymolu při změně pH. Roztok indikuje změnu z kyselého prostředí pochvy na zásadité vlivem odtoku plodové vody (z oranžové barvy na modrou). Falešný výsledek může způsobit přítomnost krve, spermatu, alkalických antiseptik, alkalické moči, mýdla nebo bakteriální vaginózy [39, 49].

Metoda pH indikačním papírkem je orientační. pH pochvy je kyselé (4,5 - 6,0) a pH plodové vody zásadité (7,1 - 7,3). Sleduje se změna barvy [49, 51].

Nitrazinový test se provádí zavedením sterilního tamponu do okolí vaginálního formixu (oblast okolo děložního čípku). Tampon je napuštěn nitrazinovým barvivem žluté barvy. Pokud tampon zmodrá, považuje se to za pozitivní výsledek (PROM). Ostatní barvy značí negativní výsledek [51]. Negativní výsledek je způsoben stejnými látkami jako u testu Temešváryho činidlem.

PROM test je založený na vysoce specifických monoklonálních protilátkách, které vážou IGFBP-1. IGFBP-1 je protein přítomný během těhotenství v plodové vodě. Produkují ho deciduální buňky. Za fyziologických podmínek se IGFBP-1 v pochvě nenachází. Při porušení plodových obalů prosakuje plodová voda do pochvy. Porušení plodových obalů umožní téct plodové vodě do pochvy, kde je pak možné detekovat IGFBP-1 [52].

Při Ferningově testu se sterilním tamponem odebere stěr z vaginálního formixu. Stěr se nanese na skleněné podložní sklíčko ve formě tenkého nátěru. Vzorek se pak zkoumá pod mikroskopem o nízkém výkonu (objektivy se zvětšením 4x nebo 10x) a sleduje se krystalizace plodové vody. Pokud vznikne vzor připomínající svým tvarem list kapradiny, je vzorek považován za PROM pozitivní [51].

V následující Tabulce č. 2 je krátký přehled neinvazivních testů PROM:

Tabulka 2: Přehled neinvazivních testů používaných k diagnóze PROM, Převzato a upraveno: [52]

Název testu	Sledovaná látka/veličina	Rozmezí hodnot
Nitrazinový test	pH	Pozitivní/negativní
ROM Check®	AFP	> 30 µg/l
PROM-TEST®	IGFBP-1	> 3 µg/l
Lac test	Laktát	≥ 4,5 mmol/l
AmniSure® ROM test	PAMG-1	> 5,0 ng/ml

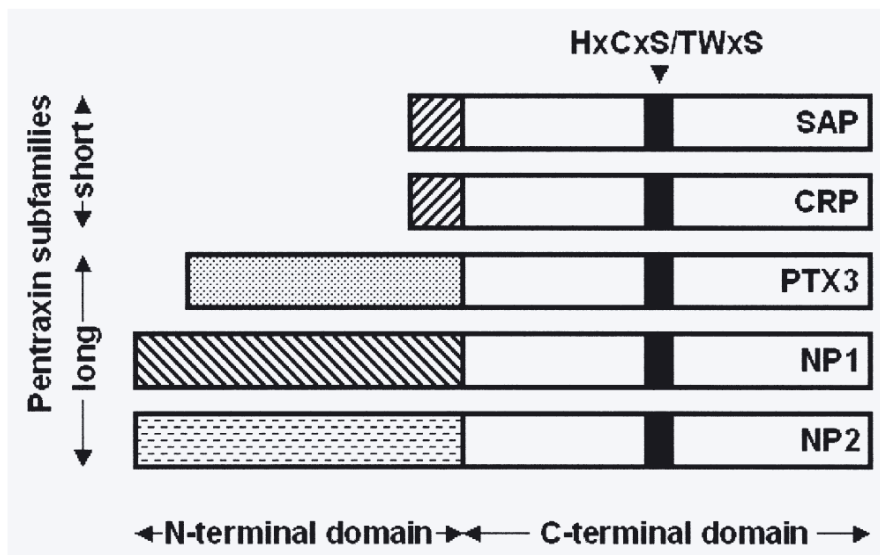
## 1.3 PENTRAXIN 3

Pentraxin 3, zkráceně PTX3, patří do superrodiny pentraxinů. Jak jejich název napovídá jedná se o proteiny s charakteristickou pentamerickou paprskovitou strukturou, která během evoluce nepodléhala změnám [53].

### 1.3.1 Superrodina pentraxinů

Rodina pentraxinů se dělí do dvou podskupin, na krátké a dlouhé pentraxiny. Obě podskupiny mají C-koncovou doménu s charakteristickou sekvencí osmi aminokyselin, známou jako pentraxinová značka, níže na Obrázku 4. Na rozdíl od krátkých pentraxinů, dlouhé pentraxiny mají navíc N-koncovou doménu navázanou na C-koncovou doménu. Krátké pentraxiny mají hmotnost okolo 25 kDa a jsou tvořeny pěti nebo deseti podjednotkami složenými do pentametu. Klasickým zástupcem krátkých pentraxinů je C-reaktivní protein (CRP) a sérový amyloid P (SAP). Jedná se o proteiny akutní fáze. Tvoří je játra jako odpověď na zánětlivé faktory, hlavně Interleukin-6 [54, 55, 56]. CRP je tvořen 5-ti neglykosylovanými podjednotkami, jejichž kvartérní struktura je stabilizována disulfidickými vazbami (Cys36-Cys97). SAP má stejnou strukturu jako CRP [56].

PTX3 byl spolu s dalšími dlouhými pentraxiny objeven v 90. letech minulého století. Jednalo se o indukovatelné geny nebo molekuly s expresí na určitých tkáních. Dlouhé pentraxiny se od krátkých pentraxinů liší svou genovou organizací, umístěním na chromozomu, buněčnými zdroji, schopností indukovat stimuly a rozpoznávat ligandy. K dlouhým pentraxinům patří kromě PTX3 i neurální PTX1, neurální PTX2, XL-PXN1 a receptory pro neurální pentraxiny [56, 58].

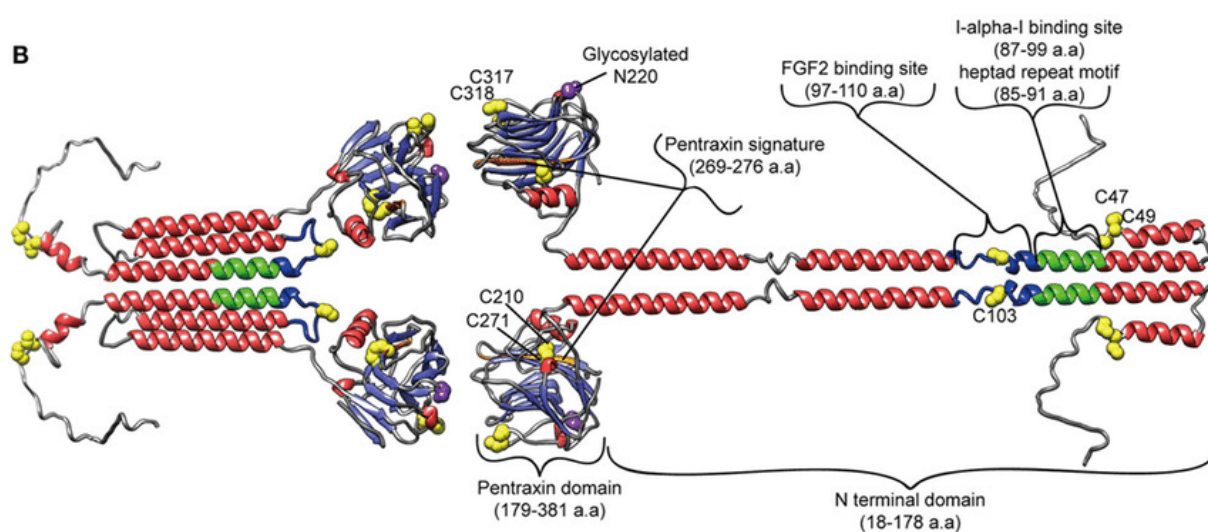


Obrázek 4: Schématické zobrazení pentraxinové superrodiny.

*Krátké a dlouhé pentraxiny mají stejnou C-koncovou doménu, ale rozdílnou N-koncovou doménu. Pentraxinová značka HxCxSx/TWxS je zvýrazněna černě, převzato z [54]*

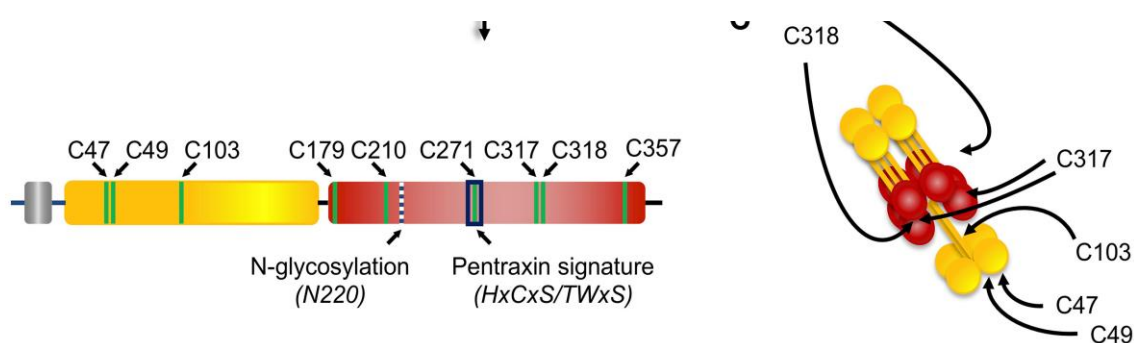
### 1.3.2 Struktura a charakterizace PTX3

Pentraxin 3 je znám i pod názvem Faktor nádorové nekrózy indukovatelný proteinem genu 14, TSG-14. Poprvé byl PTX3 identifikován ve vaskulárních endotelových buňkách a monocitech jako časný indukovaný gen. PTX3 byl produkován monocity jako odpověď na prozánětlivé cytokiny  $Il-1\beta$  a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Jeho tvorbu stimuluji také mikrobiální části, včetně lipopolysacharidů a vnějších membránových proteinů [58]. Na Obrázku 5 je uvedena 3D struktura.



Obrázek 5: 3D modelová struktura PTX3, převzato a upraveno: [59]

Gen pro lidský PTX3 se nachází na třetím chromozomu, proužek 25q. Gen kódující protein PTX3 je složen ze tří exonů. První exon sahá od 5' konce k 197 nukleotidu, druhý exon je umístěn od 198 do 599 nukleotidu a poslední exon začíná na 600 nukleotidu až ke 3'konci. První a druhý exon kódují signální peptid a N-koncovou doménu. Třetí exon kóduje C-koncovou doménu, na které se nachází pentraxinová značka HxCxS/TWxS [55], [54]. Na C-koncové doméně se nachází místo pro glykosylaci, konkrétně je to na Asn 220, níže na Obrázku 6 a Obrázku 8. Přes N-glykosylaci se zde vážou fukosylované a sialované oligosacharidy [57].



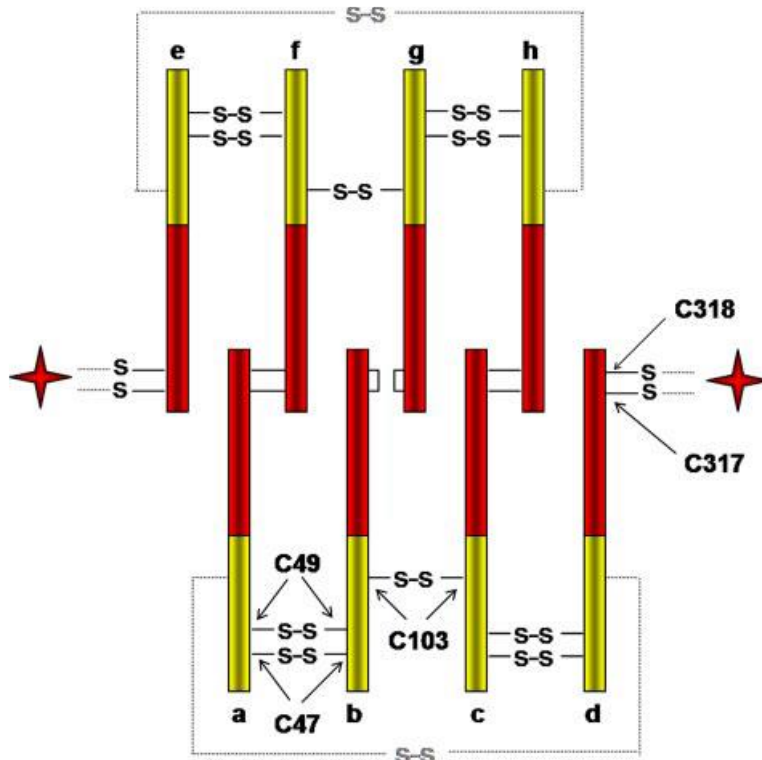
Obrázek 6: Lineární a oktamerová struktura PTX3, převzato [60]

*Na pravé části obrázku je zobrazena oktamerová struktura pentraxinu 3, v levé části je zobrazeno lineární schéma proteinu pentraxinu 3 s vyznačenými místy disulfidických vazeb, místem N-glykosylace a pentraxinové značky, převzato z [60].*

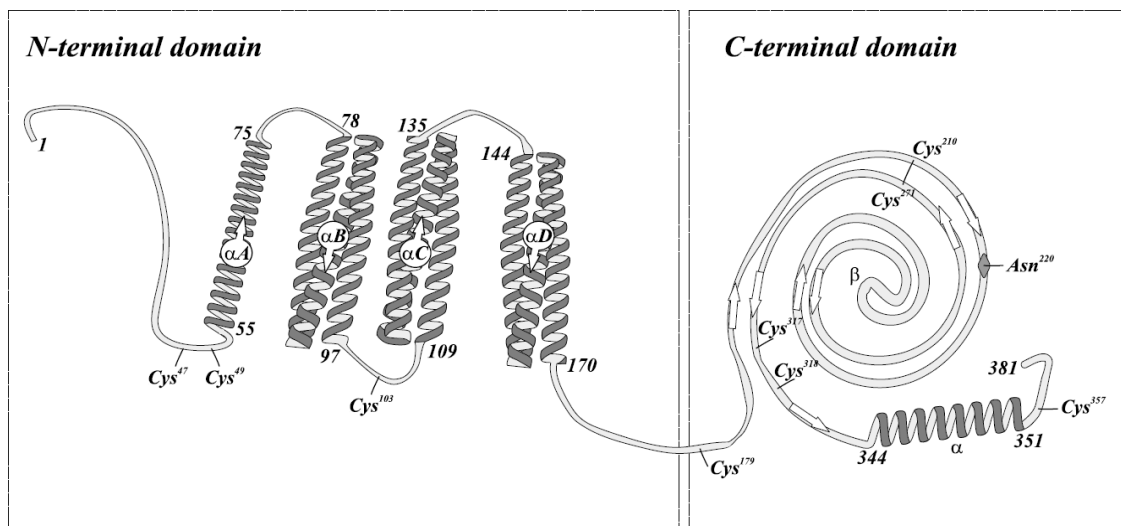
Samotný PTX3 je glykoprotein skládající se z 381 aminokyselin a mající molekulovou hmotnost 41 976 Da [61]. N-koncovou doménu tvoří 178 aminokyselin a C-koncovou doménu tvoří 203 aminokyselin. Sekundární struktura proteinu N-konce je tvořena čtyřmi  $\alpha$ -helixy spojenými krátkými smyčkami. Smyčky pomáhají stabilizovat helikální strukturu. C-konec proteinu tvoří hydrofobní jádro. Je sestaveno ze dvou antiparalelních  $\beta$ -skládaných listů s kovalentními vazbami mezi cystidinovými zbytky a jedné  $\alpha$ -helix, níže na Obrázku 8 [53].

PTX3 tvoří multimerní glykoprotein osmi identických protomerů sestavených do podoby podlouhlého oktameru, níže na Obrázku 6 [62]. Cysteinové zbytky umístěné v N-koncové doméně, tvarují protein pomocí disulfidických vazeb do podoby tetrameru. Nejprve Cys<sup>47</sup>-Cys<sup>47</sup> a Cys<sup>49</sup>-Cys<sup>49</sup> vazby stabilizují proteiny ve tvaru dimeru. Dimery se spojí do tetrameru pomocí Cys<sup>103</sup>-Cys<sup>103</sup> vazby. Následně jsou tetramery spojeny přes disulfidický můstek na Cys<sup>317</sup> a Cys<sup>318</sup> do oktameru. Disulfidické vazby jsou ukázány na

Obrázku 7. Tvar oktameru je zajištěn vnitřními a vnějšími disulfidickými můstky mezi Cys<sup>317</sup> a Cys<sup>318</sup>. Funkční forma proteinu obsahuje až šest Cys<sup>317/318</sup>-Cys<sup>317/318</sup> mezi-řetězcových disulfidických můstků [63].



Obrázek 7: Pozice disulfidických můstků v rámci oktameru struktury pentraxinu 3, převzato z [63]



Obrázek 8: Strukturální model sekundární struktury PTX3, převzato z [53]

Jak je již výše uvedeno PTX3 se exprimuje na vaskulárních endotelových buňkách a monocitech. Po stimulaci je PTX3 také produkován myeloidními dendritickými buňkami

[58], makrofágy, epitelovými buňkami [64.], ledvinami, synoviálními buňkami, chondrocyty, adipocyty [60], gliovými buňkami, fibroblasty. PTX3 je produkován i bez stimulace zánětlivými faktory, a to lymfatickými endoteliálními buňkami [65]. PTX3 lze najít ve specifických granulách zralých neutrofilů [64].

### 1.3.3 PTX3, zánětlivé podněty a komplement

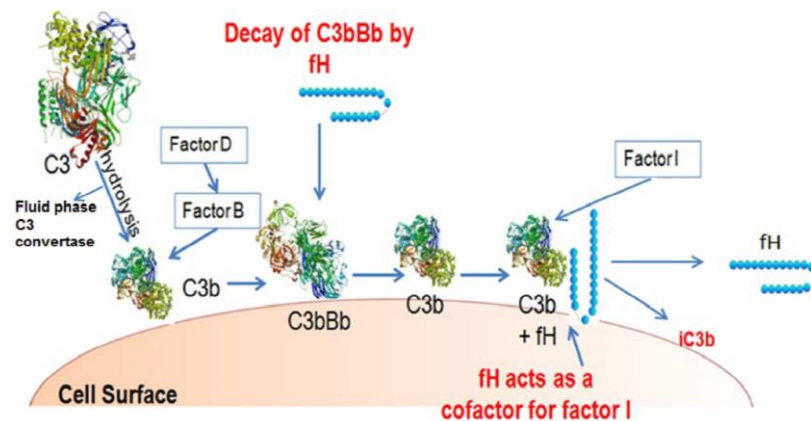
Za fyziologického stavu je hladina PTX3 v séru a tkáních velmi nízká. Při napadení těla zánětem mohou jeho hladiny stoupat z 2 ng/ml až na 200-800 ng/ml [53]. Hodnota byla zjištěna metodou sendvičovou enzymovou imunisorbentní analýzou (ELISA) [66]. Zvýšené hladiny PTX3 v séru byly zaznamenány u kardiovaskulárních onemocněních, akutního stadia infarktu myokardu, různých žilních onemocněních, autoimunitních onemocnění, revmatoidní artritidě a další řadě infekčních chorob. Zvýšené hodnoty se také vyskytují u preeklampsie [53]. Snížené hodnoty mohou ukazovat na aterosklerózu nebo žilní záněty [67]. Nedostatek PTX3 nezhorší odolnost hostitele vůči bakteriálním patogenům. Důležitost PTX3 při obranných mechanismech potvrzují dvě věci. První je, že vrozené imunitní buňky produkují vysoké hladiny PTX3 po stimulaci prozánětlivými signály nebo zapojením TLR. Zadruhé neutrofilů představují zásobárnu proteinu pro okamžité použití při rozpoznání mikrobiální infekce [64].

PTX3 se účastní regulace zánětlivých odpovědí přes různé mechanismy. Jedním z nich je vazba na P-selektin. Funkční význam této vazby byl analyzován *in vivo* na modelu leukocytového náboru. Pleurální model leukocytového náboru se závislostí na P-selektinu byl blokován PTX3. K blokaci došlo časnou akumulací neutrofilů reagujících na zánětlivé podněty [68]. Další mechanismem zapojení PTX3 do regulace zánětu jsou endoteliální buňky a buňky hladkého svalstva. Buňky uvolňují PTX3 u zánětlivých reakcí s oxidovanými lipoproteiny o nízké hustotě (ox-LDL) [69].

Základní funkcí pentraxinů je ovlivňování funkce komplementu. Vzájemná interakce mezi C1q a PTX3 ovlivňuje funkce komplementu na různých úrovních [70]. C1q je jedním z prvních ligandů, který byl pro PTX3 identifikován. Vazba dlouhého pentraxinu PTX3 se od vazby krátkých pentraxinů liší. PTX3 pro vazbu na C1q nepotřebuje agregaci proteinu nebo přítomnost  $Ca^{2+}$  iontů. Za tuto vazbu je zodpovědná oblast glykosylace na C-koncové doméně PTX3 [57]. Vazba probíhá na globulární hlavě C1q. Pro interakci je důležitý Lys170 na C řetězci C1q nebo Tyr175 na B řetězci, pokud dojde k substituci těchto dvou aminokyselin vede to ke snížení vaznosti o 40-50 % [71].

Zda dojde k aktivaci nebo inhibici komplementu Pentraxinem 3, záleží na prostředí reakce. Obě složky jsou produkovány dendritickými buňkami a operují v místech zánětu [72]. Klasická kaskáda komplementu se aktivovala *in vitro*. PTX3 zde interagoval s povrchově imobilizovaným C1q [70] a došlo k depozici C3 a C4 [71]. Inhibice komplementu nastává v tekuté fázi [57]. Interakce s C1q a následná aktivace komplementu závisí na rozsahu glykosylace PTX3. Odstranění kyseliny sialové nebo úplná deglykosylace proteinu významně zvyšuje jeho vazbu na C1q [65].

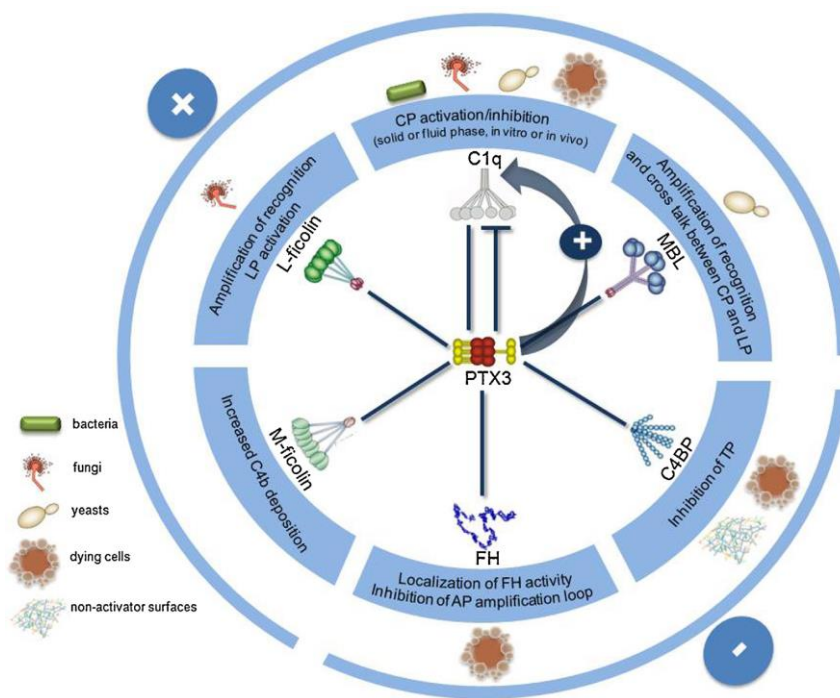
PTX3 ovlivňuje alternativní cestu komplementu. PTX3 se váže na faktor H (FH), což je regulátor alternativní dráhy. FH se váže na C3b a inhibuje vazbu faktoru B na C3b. FH funguje jako kofaktor pro faktor I, umožňuje štěpení C3b na iC3b a urychluje rozpad C3bBb, níže na Obrázku 9 [72].



Obrázek 9: Ilustrace chování faktoru H, převzato z [72]

Třetí cesta, kterou PTX3 ovlivňuje komplement, je lektinová cesta. PTX3 interaguje s ficolin-1, ficolin-2 nebo lektin vázající manózou (MBL), přehled interakcí na Obrázku 10. Tyto interakce zvyšují výskyt MBL a ficolin-2 na povrchu *Aspergillus fumigatus* a *Candida albicans* [73]. MBL s PTX3 tvoří vazbu za přítomnosti  $Ca^{2+}$ . Ficolin-1 a ficolin-2 se na PTX3 vážou přes své fibrinogen-vázající domény. Reakce se účastní i  $Ca^{2+}$  ionty [74]. Ficolin-1 se také váže na zbytky kyseliny sialové. Zbytky kyseliny sialové jsou připojené na cukry, které jsou k PTX3 připojeny přes N-glykosylaci [75]. Ficolin-1 se vyskytuje na povrchu apoptických buněk. Jeho vazba s PTX3 tak podporuje fagocytózu apoptických buněk [76].



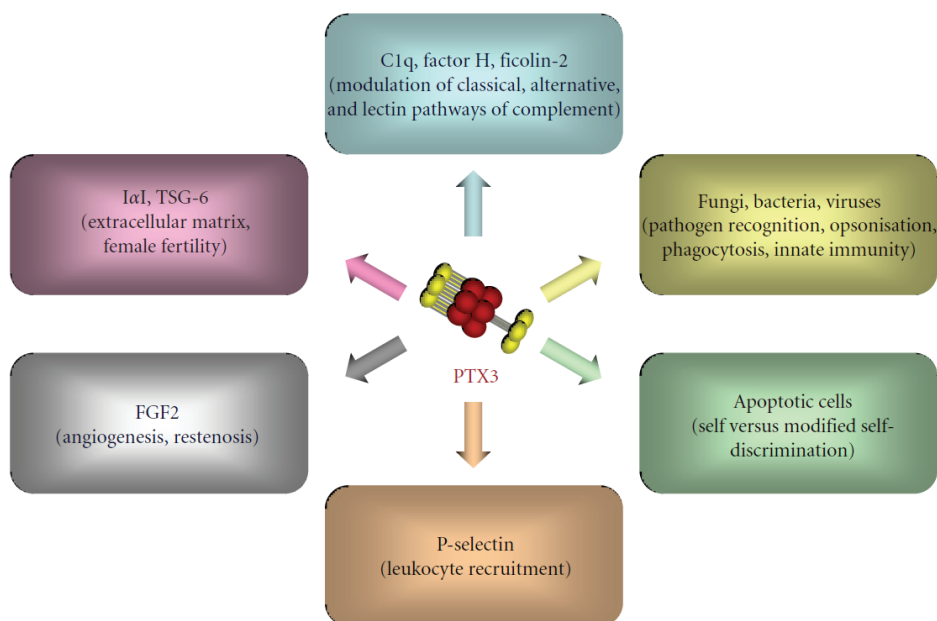


Obrázek 10: Pentraxin 3 v komplementové kaskádě z [71]

C1q i PTX3 jsou produkovány nezralými dendritickými buňkami. Jejich vazba na apoptické buňky probíhá podle podobné kinetiky, ale na jiných vazebných místech. Vazba, vytvořená mezi PTX3/C1q a buněčnou membránou apoptické buňky je stabilní. Po inkubaci apoptických buněk s PTX3 se C1q a C3 ukládaly na jejich povrch. Naopak v tekuté fázi je ukládání C1q a C3 na povrch apoptických buněk přítomností PTX3 sníženo. Přítomnost PTX3 za asistence dendritických buněk, snižuje C1q zprostředkovanou fagocytózu apoptických buněk [70].

### 1.3.3.1 Ligandy PTX3

PTX3 je schopen, stejně jako CRP a SAP, interagovat s různými ligandy, přehled ligandů je na Obrázku 11. Prvním a nejlépe popsáním ligandem je komplementová složka C1q. Dalším ligandem je faktor H. Mechanismus vazby mezi PTX3 a C1q a PTX3 s faktorem H je uveden v předchozí kapitole [70].



Obrázek 11: Ligandy Pentraxinu 3 převzato a upraveno z [65]

## Apoptické buňky

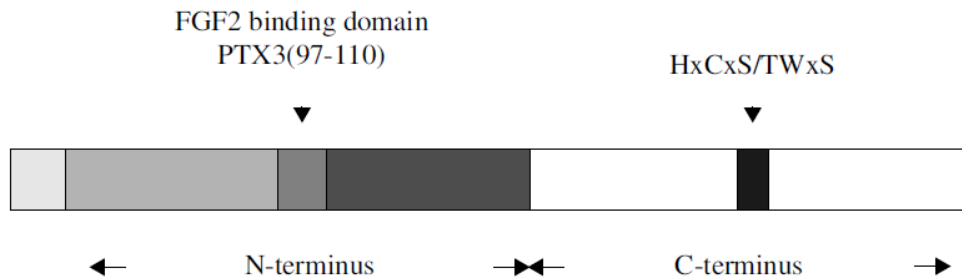
Neutrofilů jsou krátce žijící buňky, které samovolně podléhají apoptóze. Ve stadiu pozdních apoptických neutrofilů se na jejich povrchu exprimuje endogenní PTX3 a podílí se tak na jejich pohlcení makrofágem [77]. PTX3 exprimují i pozdně apoptické makrofágy. PTX3 tak napomáhá jejich odstraňování sousedními fagocyty. Exprese vazebných míst PTX3 nastává v pozdním apoptickém procesu po expozici fosfatidylserinu, rozpoznávaného annexinem V a  $\beta$ 2-GPI [78].

## Fibroblastový růstový faktor 2

Fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2) má řadu funkcí ovlivňující různé tkáně. FGF-2 interakcí s buňkami může vyvolat expresi nebo aktivaci molekul pro regulaci buněčné proliferace [79]. Oblast s největším uplatněním pro FGF-2 je cévní endotel. FGF-2 je hlavní spouštěč buněčné proliferace, chemotaxe a produkce proteinů v endotelových buňkách [65]. FGF-2 působí na proliferaci nervové tkáně. Předpokládá se, že FGF-2 blokuje apoptózu nervových buněk [80] a neurální tkáně mohou regulovat jeho expresi [81].

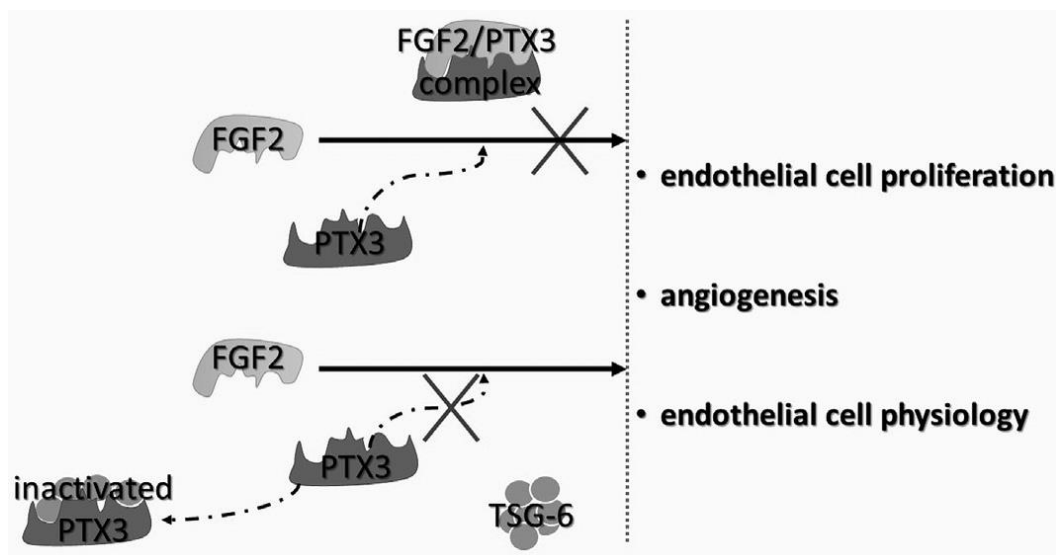
Žádný jiný člen z fibroblastických růstových faktorů netvoří s PTX3 vazbu, pouze FGF-2 [82]. PTX3 inhibuje angiologickou aktivitu, vyvíjenou FGF-2 na endotelové buňky. PTX3

také potlačuje aktivaci hladkého svalstva způsobenou FGF-2. Na rozdíl od ligandů z komplementové kaskády, se FGF-2 váže na N-konec PTX3, níže na Obrázku 12. Tuto vazbu potvrzuje několik experimentů, kde CRP a SAP byly neschopni vazby s FGF-2, i když mají stejnou sekvenci C-koncové domény. Dalším příkladem je, že rekombinantní N-konec PTX3 svou vazbou na imobilizovaný FGF-2, zabraňuje PTX3/FGF-2 interakci a inhibuje aktivitu FGF-2 v endotelových buňkách [83].



Obrázek 12: Doména pro vazbu fibroblastového růstového faktoru na Pentraxinu 3, převzato a upraveno z [84]

FGF-2 působí na cílové buňky interakcí s vysoce afinitním receptorem fibroblastického růstového faktoru (FGFR) a nízko afinitním heparansulfát proteoglykanem (HSPG) tvorbou tříložkového komplexu HSPG/FGF-2/FGFR. Vazba mezi PTX3 a FGF-2 zabraňuje tvorbě tohoto komplexu [84]. Studie naznačují, že PTX3 vázaný na FGF-2 vytváří sterickou zábranu pro navázání dalších molekul [82]. Samotný oktamer PTX3 dokáže navázat jen dvě molekuly FGF-2 místo předpokládaných osmi molekul [85]. V porušených cévách je inhibiční schopnost PTX3 narušena. To je způsobeno zvýšenou produkcí fibroblastového růstového faktoru 9 (FGF-9). FGF-9 se začne vázat na FGF-2 a PTX3 jej tak nemůže inhibovat. Další molekulou schopnou bránit PTX3 vazbě na FGF-2 je faktor nádorové nekrózy indukovatelný proteinem genu 6 (TSG-6). TSG-6 váže PTX3 a zabraňuje tak jeho interakci s FGF-2, u které PTX3 způsobuje inhibici. Schéma inhibice je na Obrázku 13 [86].



Obrázek 13: Aktivace a inhibice komplexu Pentraxin 3/fibroblastický růstový faktor 2, převzato z [86]

## P-selektin

Tento protein patří k selektinům, což jsou molekuly zprostředkovávající adhezivní interakce mezi endotelem, leukocyty a krevními destičkami [87]. Jedná se o integrální membránový protein nacházející se v granulích krevních destiček a ve Weibel-Paladeho granulích endotelových buněk. Po stimulaci těchto buněk agonistou (např. trombinem) je P-selektin exprimován na plasmatické membráně [88]. P-selektin je považován za stěžejní faktor při zahájení adheze leukocytů a endotelových buněk [86]. P-selektin podporuje usazování a pohyb leukocytů v reakci na zánětlivé signály. P-selektin interaguje se svým protireceptorem P-selektinovým glykoproteinovým ligandem-1 nacházejícím se na mikroklcích leukocytů [89]. Na základě těchto informací se předpokládá, že P-selektin je zapojen do vzniku aterosklerózy [90] a tvorbě zánětu při akutním infarktu myokardu [65].

Za vazbu P-selektinu na neutrofilů je zodpovědný glykoproteinový ligand P-selektinu-1 (PSGL-1). PSGL-1 je homodimer s dvěma podjednotkami propojenými disulfidickými můstky. Vazba PSGL-1 na P-selektin je specifická a závislá na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech. Biochemická analýza ukazuje, že jde o těžce sialovaný glykoprotein. Na PSGL-1 je vázán jeden či více N-glykanů, několik O-vázaných oligosacharidů a sialovaný Lewis X ( $\text{sLe}^x$ ) [91]. Pro vazbu P-selektinu na PSGL-1 jsou využity pouze O-vázané oligosacharidy [92].

Vazba PTX3 na P-selektin je kompetitivní, zabraňuje vazbě P-selektinu na jeho specifický receptor [86]. Vazba P-selektinu probíhá přes N-glykosidové skupiny na

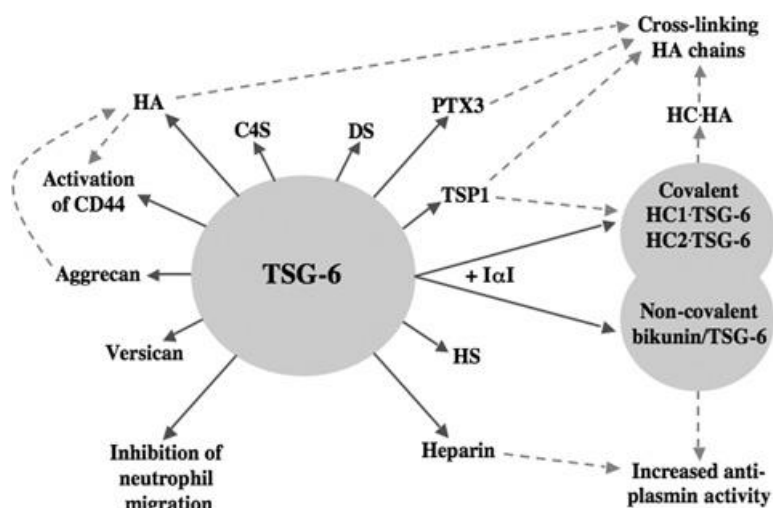
C-koncové doméně PTX3 [93]. Tato vazba inhibuje valivý pohyb leukocytu po endotelu [65]. Exogenně a endogenně uvolněný PTX3 působí svou vazbou na P-selektin jako negativní regulátor zpětné vazby a způsobuje endotelovou dysfunkci [86]. Působí jako prevence nadměrného náboru neutrofilů závislých na P-selektinu [93].

Lidský, purifikovaný PTX3 má desetkrát silnější vazbu na P-selektin, než rekombinantní PTX3. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben rozdílnou glykosylací PTX3. U PTX3 z různých zdrojů byly pozorovány rozdíly v bi-, tri- a tetra-antennárních glykosylovaných strukturách, stejně jako u různě sialovaných oligosacharidů [68].

### **Faktor nádorové nekrózy indukovatelný proteinem genu 6**

Faktor nádorové nekrózy indukovatelný proteinem genu 6, zkráceně TSG-6, je malý protein tvořený dvěma modulárními doménami. TSG-6 má přes svou velikost velké množství funkcí, např. formování funkce imunitních a stromálních buněk, nebo přispívá k tvarování, fungování a remodelaci extracelulární matrix [91], jako je např. glykosaminoglykan kyselina hyaluronová (HA), chondroitin-4-sulfát (C4S) a další [94]. Přehled je na Obrázku 14. Exprese genu TSG-6 je přísně kontrolována prozánětlivými cytokiny TNF a IL-1 [95]. TSG-6 není primárně přítomen ve zdravých tkáních. Začne být produkován až jako odpověď na zánětlivé podněty a zánětu podobné mechanismy. Do těchto mechanismů patří ovulace, nebo cervikální dozrávání [94]. Ve většině případů TSG-6 vykazuje protizánětlivé vlastnosti a ochranu tkáně [91].

PTX3 a TSG-6 se podílejí na vývoji zánětu. Rychlost dostupnosti PTX3 může ovlivnit odpověď organismu na zánětlivý podnět. TSG-6 svým působením v místě zánětu může ovlivnit pohyb neutrofilů a případně zabránit poškození tkáně [95].



Obrázek 14: Faktor nádorové nekrózy-indukovatelný proteinem genu 6 a jeho vazba na ligandy, převzato z [96]

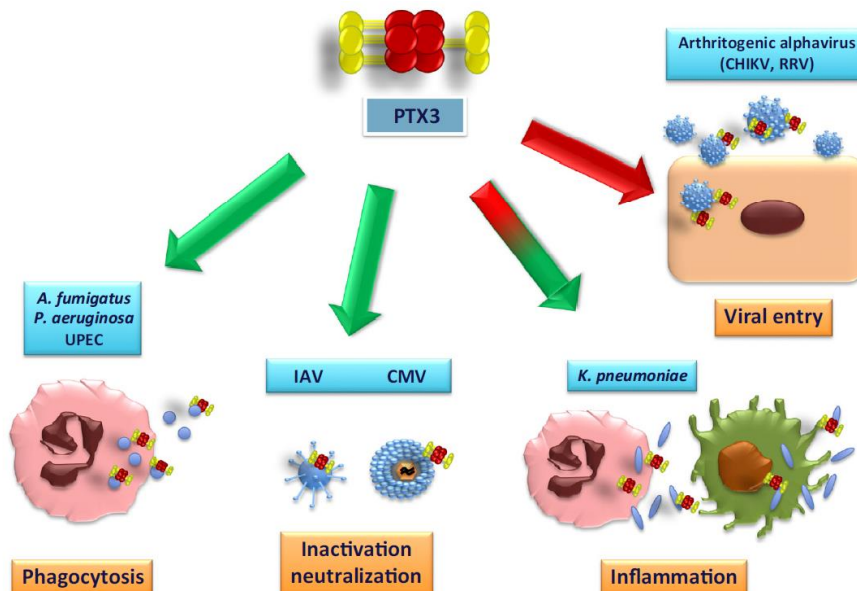
Před ovulací je TSG-6 syntetizován ve vaječniku, kde se spolu s HA a inter- $\alpha$ -inhibitorem ( $I\alpha I$ ) stává součástí zvětšující se viskoelastické matrice, která obklopuje oocyt před jeho uvolněním z ovariálního folikulu. Předpokládá se, že PTX3 se váže na TSG-6 a  $I\alpha I$  a vytváří spolu komplex, který podporuje síťování HA [97]. Ve skutečnosti se ale PTX3 na TSG-6 v matrici neváže a neváže se ani na HA. Pro vazbu je nejprve nutná interakce PTX3/TSG-6/ $I\alpha I$  nebo PTX3/ $I\alpha I$  a následně pak s TSG-6/HA [98]. Všechny tři molekuly mají klíčovou roli ve strukturální organizaci extracelulární matrix cumulu oophoru, jenž je nezbytný pro *in vivo* oplodnění. Pokud nějaká z těchto molekul není přítomná v dostatečném množství, může to způsobit poškození a nestabilitu zvětšujícího se cumulu oophoru. Nestabilita cumulu oophoru vede k jeho rozpadu vlivem mechanického namáhání [97]. Poškození pak může vést k subfertilitě nebo sterilitě [99].

### Bakterie, viry a plísňe

PTX3 se váže na specifické patogeny, jako jsou bakterie, viry a plísňe, níže na Obrázku 15. Vazba patogenů PTX3 probíhá díky receptorům rozpoznávání vzorů (PRRs) [58]. PTX3 může svou vazbou na patogen zesílit zánětlivou reakci. Takto zesílená reakce byla potvrzena u interakce mezi PTX3 a proteinem A vnější membrány *K. pneumoniae* (KpOmpA) [65]. PTX3 působí jako opsonin a urychluje pohlcování bakterií, nebo zraní neutrofilních fagozomů. Nízké hladiny PTX3 vedly k dlouhodobé neschopnosti kontroly šíření infekce [100].

PTX3 je předmětem různých studií, kde se sleduje jeho působení na různé mikrobiální kmeny. Ve studii zaměřené na jeho vztah se *Shigella*, sledovali u infikovaných myší plicní infekci. *Shigella* navázaná na PTX3 nebyla schopna kontaktu s hostitelskou buňkou. Podobné chování zapříčiňují i protilátky, které se váží na povrch *Shigella* a podporují tak její fagocytózu. PTX3 tak funguje jako ante-protilátky a při nízkých koncentracích zvyšuje účinnost komplementu [101].

Se zaměřením na infekční onemocnění v lidském organismu lze PTX3 využít jako biomarker závažnosti onemocnění. PTX3 se účastní zánětlivého procesu způsobeným několika mikrobiálními kmeny, např. *Aspergillus fumigatus* [102], *Pseudomonas aeruginosa* [103], *Klebsiella pneumoniae* [104], *Neisseria meningitidis* [105]. Vysoké hladiny PTX3 měli pacienti s těžkou sepsí či bakteriemií. Ve srovnání s CRP působil PTX3 jako specifitější prognostický identifikační znak [106]. Kromě těchto onemocnění je PTX3 možným identifikačním znakem u pacientů s horečkou na pohotovostním oddělení pro určení bakteriémie a akutního městnavého srdečního selhání [107]. Avšak vysoká hladina PTX3 neznamena, že se jedná o bakteriální infekci. PTX3 není specifickým identifikačním znakem pro tato onemocnění. Tyto hodnoty mohou být způsobeny i kardiovaskulárním onemocněním, rakovinou plic, infekcí virem dengue nebo leptospirózou [108].



Obrázek 15: Vazba Pentraxinu 3 na vybrané mikroorganismy, upraveno a převzato z [109]

Interakce mezi PTX3 a plísněmi je možná díky zymosanu. Jedná se o glukan nacházející se na povrchu plísní a kvasinek, kde působí jako opsonin. V přítomnosti zymosanu exprimovali makrofágy vyšší hladiny PTX3 mRNA. PTX3 váže zymosan a vytváří multimery, které mají podobu dekameru. Předpokládá se, že tato agregace vede k navýšení počtu částic, které jsou následně vystaveny aktivovaným makrofágům. Při normální plísňové infekci, vytváří aktivace a sekrece PTX3 pozitivní zpětnou vazbu pro likvidaci patogenu [110].

V souvislosti mezi viry a PTX3 se nejvíce zkoumá cytomegalovirus (CMV). V této studii se zaměřovali na infekci způsobenou CMV při transplantaci kostní dřeně. Zjistili, že příjemce s PTX3 haplotypem h2/h2 a pozitivním sérotypem na přítomnost CMV, je po transplantaci kostní dřeně náchylnější k infekci CMV [111]. PTX3 váže CMV přes zbytek kyseliny sialové. Ta je na PTX3 připojena přes glykosylaci. PTX3 brání infekci CMV nebo její reaktivaci [113, 114].

*A. fumigatus* je jedním ze zástupců plísňových kmenů se kterými PTX3 interaguje. Zjistilo se, že myši s deficitem PTX3 jsou náchylnější k infekci *A. fumigatus*. V jejich případě šlo o chybné rozpoznávání konidií alveolárními makrofágy a dendritickými buňkami. Při podávání rekombinantního PTX3 se jejich stav zlepšil [114]. PTX3 usnadňuje makrofágům pohlcení konidií *A. fumigatus*. Konidie *A. fumigatus* jsou schopné vyvolat produkci PTX3. Jde o rychlou reakci, zvýšené hodnoty PTX3 jsou v buňkách patrné již po 1 hodině [115]. Bylo zjištěno, že PTX3 je vázán myeloidním diferenciacním faktorem (MD-2). Toto spojení podporuje vazbu PTX3 na konidie. Vazba MD-2 na PTX3 uvolňuje odumřelou tkáň. Tím brání jeho imunoregulační aktivitě během infekce. Účinek komplexu PTX3–MD-2 se potvrdila u myši s deficicientním MD-2. Postižené myši nereagovaly na antifungální ochranný účinek PTX3 a snadněji podléhaly infekci [112]. Specifické genetické polymorfismy PTX3 jsou rizikovým faktorem při plísňové infekci [113]. PTX3 byl studován i jako možný identifikační znak plísňových infekcí u pacientů se sníženou imunitou. CRP jako zánětlivý protein nebyl vůbec zvýšený, naopak hladina PTX3 byla vysoká. Byla patrná i korelace mezi PTX3 a vývojem onemocnění. U pacientů pozitivně reagujících na léčbu došlo k rychlému a významnému snížení PTX3 [116].



### 1.3.3.2 PTX3 v těhotenství

Během implantace dochází v těle matky k různým změnám, které mají zaručit optimální vývoj a růst plodu. Aby se zabránilo odmítnutí aloimplantátu plodu, je nutné regulovat vrozenou imunitu matky. Na interakci mezi matkou a plodem se podílí několik faktorů, včetně hormonů, růstových faktorů, cytokinů, chemokinů, složek extracelulární matrice a enzymů degradujících matrix [117]. Některé interakce mohou vést k lokální zánětlivé reakci a způsobit zvýšené hladiny zánětlivých cytokinů. PTX3 se podílí jak na zánětu, tak i na vrozené imunitní odpovědi [118]. PTX3 se cíleně zaměřuje na fagocyty mezi umírajícími a dendritickými buňkami, kde aktivně omezuje aktivaci T lymfocytů. Při vývoji placenty, má pravděpodobně PTX3 klíčovou úlohu v potlačování zkřížené prezentace antigenů plodu mateřským T lymfocytům, jako prevenci před aloimunizací. K tvorbě PTX3 během těhotenství dochází kvůli apoptóze buněk, která je spojena s obnovou extracelulární matrix [119]. K podstatnému zvýšení hladiny PTX3, pak dochází v době porodu, kdy dojde k apoptóze buněk spolu s řízenou degradací extracelulární matrix [120].

Ve fyziologickém těhotenství je PTX3 neustále tvořen placentou. Ženy v různém stupni těhotenství v krvi mají obsažen PTX3, jehož hladina koreluje se stupněm těhotenství [121]. Zvýšené nebo snížené hladiny PTX3 jsou předmětem studií patofyziologie v těhotenství. Nejčastěji je PTX3 sledován ve spojitosti s preeklampsií, nebo spontánním předčasným porodem, hlavně v případech vaskulopatie placenty [70].

V této studii byli schopni určit, že riziko výskytu předčasného porodu se zvyšuje o 1 % s nárůstem koncentrace 1 pg/ml PTX3 v plodové vodě [121]. Hodnota byla zjištěna metodou ELISA a postupovalo se podle instrukcí výrobce. Hladiny PTX3 se zvyšují po dobu více jak 7 dnů před předčasným porodem, nelze ho proto brát jako indikátor pokročilého stadia porodu. Jako důvod zvýšené hladiny PTX3 se předpokládá, že ji způsobují jiné mechanismy než infekce, například poškození způsobené placentární hypoperfuzí [38].

Preeklampsie je onemocnění, které se vyznačuje vysokým tlakem a proteinurií během těhotenství. Je charakteristická placentární hypoxií a ischemií, vysokým oxidativním stresem ve spojení s dysfunkcí endotelu [122]. Preeklampsie je často doprovázena intrauterinní růstovou restrikcí plodu (IUGR). Nejedná se o nemoc jako takovou, jde spíše o soubor projevů dysfunkcí plodu nebo matky. Nejčastěji je spojena s chromozomálními vadami [123]. PTX3 je jedním z klíčových faktorů v patofyziologii preeklampsie. Tu doprovází zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů. Pozorované hladiny PTX3 u fyziologických těhotenství

byly během každého trimestru v průměru o něco vyšší než u negravidních žen. U preeklampsie a IUGR byla hladina PTX3 významně vyšší než u žen s fyziologickým těhotenstvím. U žen, které měly zvýšenou hodnotu PTX3 v prvním trimestru se následně vyvinula preeklampsie, ale ne IUGR [124]. U žen s fyziologickým nebo preeklamptickým těhotenstvím nebyly nalezeny rozdíly v placentární a deciduální expresi PTX3. Při preeklampsii byla imunopozitivita PTX3 v endotelu peritoneálních cév výraznější, než ve fyziologickém těhotenství [125]. V preeklamptických placentách je zvýšené poškození tkáně, což má za následek zvýšenou hladinu PTX3. Produkce PTX3 byla určena imunohistochemicky, pomocí negativního imunologického barvení endoteliálních buněk [119]. Při porovnávání hladin PTX3 mezi preeklampsii a IUGR se zjistilo, že u samotného IUGR byly hladiny PTX3 významně rozdílné při porovnání s fyziologickým a preeklamptickým těhotenstvím. Nižší hladiny PTX3 u preeklampsie spojené s IUGR, než u samotné preeklampsie, ukazují na zapojení PTX3 spíše do placentární dysfunkce. PTX3 lze najít i při porodu v plazmě plodu [126].

Hladina PTX3 v plodové vodě, je za přítomnosti intra-amniálního zánětu (dále jen IAI) nebo akutní histologické chorioamniotidy zvýšená [127, 128]. Koncentrace PTX3 v plodové vodě korelovala s mikrobiální zátěží *Ureaplasma sp.* Jako cut-off pro určení PROM těhotenství zkomplikovanými přítomností IAI nebo mikrobiální IAI, byla určena hodnota 11 ng/ml PTX3 v plodové vodě. Hodnota byla zjištěna metodou ELISA, konkrétně Quantikine human PTX3/TSGL14 a postupovalo se podle instrukcí výrobce. [129].

Během těhotenství s PROM se PTX3 vyskytuje také v cervikální tekutině. Jeho koncentrace jsou vyšší v případech přítomnosti IAI, MIAC, než u těhotenství s PROM. Zvýšená hladina se vyskytovala i u žen s IAI. Ženy se sterilní IAI zvýšenou hladinu neměly. Koncentrace PTX3 v cervikální tekutině je pravděpodobně vyšší než v plodové vodě. Z čehož vyplývá, že endotelové, epiteliální a imunitní buňky produkují PTX3 a účastní se tak obrany proti mikrobiální invazi [130].

Ženy s předčasným porodem, nebo s PROM mají v plazmě vyšší koncentrace PTX3 než ženy s fyziologickým těhotenstvím. Zvýšená hladina plazmatického PTX3 může mít spojitost přes IUGR s růstovou restrikcí (SGA) plodu. V této studii pozorovaly souvislost mezi zvýšenou hladinou PTX3 a SGA plodem kvůli patologickému IUGR. Nebyla však zpozorována žádná souvislost u žen s fyziologickým SGA plodem, a proto lze považovat PTX3

jako diskriminační identifikační znak pro těhotné ženy v třetím trimestru s SGA plodem [131].

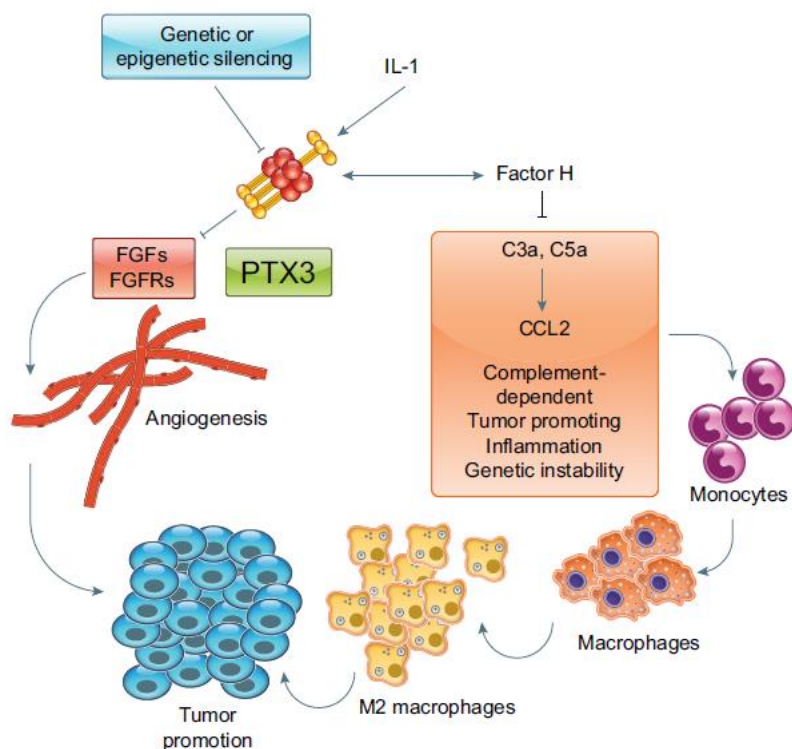
Zvýšená plazmatická koncentrace PTX3 byla pozorována i u žen s opakovanými potraty bez příčiny (URPL). Porovnávali se koncentrace PTX3 mezi pacientkami s primárním opakovaným potratem a ženami ve stejném týdnu těhotenství. Byla nalezena pozitivní korelace mezi koncentrací PTX3 a počtem předchozích potratů. Rozdíl v koncentracích PTX3 byl i u žen bez předchozího živého narození a žen s již několika živými porody [133, 134].

### **1.3.4 PTX3 a nádorová onemocnění**

Studie na myších ukazující pozitivní spojení mezi expresí PTX3 a špatnou prognózou u konkrétních rakovinových onemocnění lidí. Jestli PTX3 potlačuje nebo podporuje rozvoj nádorových onemocnění, je závislé na typu tkáně, rakoviny nebo buněčném zdroji. Odporuje to tak tvrzení, že PTX3 má v nádorových onemocněních přesně určenou úlohu [114].

PTX3 se účastní regulace tvorby zánětů nádorových onemocnění (dále jen CRI). Jako tumor supresorový gen, spolu s ovlivňováním komplementové kaskády utlumuje CRI. Myši s deficientním PTX3 mají zvýšenou náchylnost ke karcinogenezi. PTX3 je u vybraných lidských nádorů inhibován nadměrnou metylací DNA promotoru a zesilovače. Zesilovač, je základním prvkem DNA, který může určit expresi tkáňově specifického genu. PTX3 je regulován dvěma zesilovači a jejich hypermethylace je zodpovědná za jejich inaktivaci při CRI [132]. Spojení mezi nedostatkem PTX3 a poškozením DNA bylo potvrzeno zvýšenou mutací Trp53, oxidačním poškozením DNA a expresí markerů poškození DNA. V souladu s s předpokladem, že CRI přispívá ke genetickým případům způsobujících rakovinu a genově nestabilní nádory [133].

Genetické studie ukázaly, že myši s nedostatkem PTX3 měli sklony k mezenchymální a epiteliální karcinogenezi u karcinogeneze způsobenou 3-methylcholanthrenem a 7, 12 - dimethylbenz [ $\alpha$ ] antracen, nebo kyselinou tereftalovou [134], nebo indukované rakovině kůže. U těchto nádorů byl pak PTX3 produkován infiltrujícími makrofágy jako odpověď na IL-6. Nádory s nedostatkem PTX3 měly typickou zvýšenou infiltraci makrofágů, produkci prozánětlivých cytokinů, aktivaci komplementu a angiogenezi [60]. Schéma je na Obrázku 16.



Obrázek 16: Úloha Pentraxinu 3 v nádorovém bujení převzato a upraveno z [135]

Několik linií důkazů ukazuje, že nedostatek PTX3 spouští neomezenou aktivaci komplementu za tvorby C5a, CCL2 a zvýšeným náborem tumor-podporujících makrofágů [136]. Nedostatek PTX3 také způsobuje zvýšení oxidativního poškození DNA a genetickou nestabilitu, v porovnání s nádory divokého typu [60]. U několika vybraných lidských nádorů byl gen pro PTX3 zablokován metylací DNA promotoru a domnělého zesilovače [132]. Proto, tato základní složka vrozené imunity a regulátor aktivace komplementu působí jako vnější onkosupresor na úrovni komplementem zprostředkovaného, makrofágem podporovaného, tumor podporujícího zánětu [136]. U myši s nedostatkem PTX3 šlo genetickou inaktivací C3 a inhibicí CCL2 zvrátit zvýšenou náchylnost k mezenchymální karcinogenezi a nábore tumor-podporujících makrofágů. Ukázalo se, že PTX3 reguluje ukládání C3 v buňkách sarkomu pomocí interakce a vazbou negativního regulačního faktoru H [137]. Nadměrná exprese PTX3 v nádorových buňkách je spojena se sníženou angiogenezí a tumorigením potenciálem myších nádorů závislých na FGF, včetně rakoviny prostaty. Transgenní myši s nadměrnou produkcí PTX3 v endoteliálních buňkách, jsou chráněny od nádorových modelů závislých na FGF. PTX3 se přes N-koncovou doménu váže na vybrané FGF, včetně FGF2 a zabraňuje tak

FGF dependentní angiogenní odezvě [73]. Role PTX3 má autokrinní/parakrinní úlohu ve stimulování prorůstových faktorů ve stromálních buňkách obklopující nádorové buňky [136].

Vlivem produkce některých zánětlivých cytokinů (např. IL-6, TNF $\alpha$ ) jsou různé typy rakovinných buněk schopny metastáz. Exprese PTX3 je stimulována zánětlivými cytokiny, což naznačuje jeho možnou roli jako mediátoru zánětu zahrnujícího progresi nádoru v těchto zánětlivých stavech. V této studii zjistili, že PTX3 spojený s rakovinou žaludku zvýšil migrační potenciál rakovinných buněk, nejen u rakoviny žaludku, ale i u rakoviny pankreatu a výše zmíněné rakoviny prsu [135]. V různých studiích se zabývaly PTX3 jako možným identifikačním znakem pro nádorová onemocnění. PTX3 napomáhá diferenciaci buněk rakoviny. Lze ho tak využít, jako identifikační znak pro špatně diferenciovaný karcinom prsu [138]. Dále se zjišťoval klinický význam PTX3 u kostních metastáz karcinomu prsu. Extracelulární PTX3 byl produkován přímou sekrecí buňkami kostních metastáz karcinomu prsu. Vysoká hladina PTX3 korelovala s metastázemi v kostech, v porovnání s jinými tkáněmi u rakoviny prsu [139]. Ve spinocelulárním karcinomu hlavy a krku (dále jen HNSCC) je PTX3 produkován metastázemi a maligní tkání. Jeho exprese je indukována epidermálním růstovým faktorem (dále jen EGF). Autokrinní produkce PTX3 pozměnila produkci metastatických molekul, např. zvýšení fibronektinu a matrixové metaloproteázy-9, což způsobilo nárůst nádorových metastáz. PTX3 indukovaný EGF zlepšil interakci mezi endotelovými a nádorovými buňkami. To naznačuje, že ovlivňuje adhezi nádorových buněk. Narušením adheze lze zabránit šíření metastatického HNSCC. Kombinace inhibitorů receptorů EGF a protilátek k neutralizaci PTX3 by se mohla zabránit metastázám HNSCC [140]. Dalším onemocněním, kde může PTX3 působit jako potenciální identifikační znak je maligní gliom. Nádorové buňky produkovaly PTX3 v mikroprostředí gliomu. Hladina místního PTX3 spolu s pronikajícími CD68 pozitivními makrofágy korelovala s malignitou [141]. K proteinům, které se studovali jako identifikační znaky pro rakovinu močového měchýře patří i PTX3. Buňky močového epitelu produkují PTX3 jako prevenci močových infekcí. Analýza databází a imunohistochemických dat ukázala, že nízká hladina PTX3 umožnila vývoj rakoviny z lehkého do vážného stupně a může dojít až k její invazi do svalů. Ovlivňování exprese PTX3 v buňkách močového epitelu ukazuje, že progresivní epigenetické umlčování PTX3 usnadňuje proliferativní potenciál buněk BC a progresivně podporuje zvýšení metabolické přeměny rakovinných buněk směrem k více glykolytickému agresivnímu fenotypu. Ke snižování PTX3 docházelo pomocí tlumení shRNA [142].

Rakovina prostaty patří k onemocnění, kde figuruje PTX3. Experimentální data ukazují na neredundantní autokrinní/parakrinní roli systému FGF/FGFR v růstu, vaskularizaci a šíření rakoviny prostaty. To vede až k resistenci androgenních receptorů na hormony. V této studii se konkrétně zabývali FGF8b [143]. FGF se podílejí na nepřiměřené aktivaci signální kaskády růstových faktorů, která tlumí citlivost ke steroidním hormonům. Snížená citlivost vede ke vzniku odolného novotvaru s necitlivostí na terapii snížením vlivu hormonů. PTX3 je antagonistou FGF8b a má antiangiogenní a antineoplastickou aktivitu. PTX3 se na FGF8b váže a brání tak, vazbě FGF8b na FGFR [144]. Proto je pro léčbu nádorů systém FGF/FGFR cílovou strukturou [143].

### 1.3.5 Role PTX3 při reparaci tkání a v procesu angiogeneze

PTX3 je zapojen do procesu remodelace tkání, včetně ukládání extracelulární matrix a angiogeneze [65]. V místě rány, různé buňky produkují PTX3 jako odpověď na aktivaci TLR a zmnožení IL-6. Ve sraženině se PTX3 nachází jako důsledek degranulace neutrofilů [62]. Nejvíce PTX3 produkují mezenchymové buňky. V pozdější fázi poranění, lze PTX3 najít ve strupu a nově vytvořené tkáni [145]. U myši s různými případy neinfekčního poškození tkáně (poranění kůže excizí a chemicky zapříčiněné zranění jater a plic) se tvořila pericelulární fibrinolýza způsobená interakcí plazminogenu (dále jen Plg), fibrinu a PTX3 [62]. PTX3 se na Plg váže přes jeho KR5 doménu, která spouští konformační změny v molekule Plg [145]. PTX3 interaguje se složkami hemostatického systému a fibrinolytické kaskády v kyselém prostředí, které nastává při poškození tkáně. Tato interakce podporuje remodelaci zánětlivé matrix bohaté na fibrin a zajišťuje opravu tkáně [102]. Zvýšení kyselosti prostředí napomáhá určit místo interakce s PTX3. Interakce bude probíhat pouze v místě poranění, a ne v celém organismu [73]. Také určuje úlohu PTX3 v opravě tkáně, aniž by to narušilo jeho antimikrobiální rozpoznávání a interakci se složkami komplementu [145].

Nedostatek PTX3 mění způsob trombotické odpovědi při poranění tkáně [146]. PTX3 deficientní makrofágy a mezenchymální buňky se *in vitro* měly defektivní pericelulární fibrinolýzu. Při experimentech *in vivo* se makrofágům a mezenchymálním buňkám nedařilo proniknout do fibrinové matrix a tím byla znemožněna její remodelace [73]. V ranách divokého typu PTX3 a Plg ohraničují pericelulární matrix mezenchymových buněk. U ran s nedostatkem PTX3, je Plg s mezenchymovými buňkami rozptýlen ve fibrinové matrix [145]. U myši s nedostatkem PTX3 docházelo k nadměrnému hromadění fibrinu a zvýšenému ukládání kolagenu. Toto hromadění bylo ukázané u poranění kůže, jater a plic [73]. To spolu

s předčasnou kontrakcí rány, opožděnou reepitelizací, a následnou hyperplazií epitelu s defektní tvorbou hojící se tkáně, způsobilo defekty v hojení kožních poranění u myši [146]. Myši mají, na rozdíl od lidí, u fyziologického hojení ran i fázi kontrakce rány, která omezuje vstup mikrobů a usnadňuje uzavření rány [145].

PTX3 se uplatňuje v remodelaci kostní tkáně. Mladé myši s deficitem PTX3 měli nižší množství trámčité hmoty v dlouhých a axiálních kostech. Je tu patrný pohlavní dimorfismus, kde samice měly nižší rychlost tvorby kostí než samci. *In vitro* je PTX3 exprimován diferencujícími osteoblasty, *in vivo* jej exprimují osteoklasty matrix [147]. Hlavním spouštěčem pro produkci PTX3 je TNF- $\alpha$ , který stimuluje prekurzor osteoblastu. Díky aktivaci TNF- $\alpha$  se zvýší osteoblastomová produkce ligandu aktivačního receptoru nukleárního faktoru  $\kappa$ -B, což vede k tvorbě nadměrné tvorbě osteoklastů [148]. Při zlomenině je PTX3 exprimován v časně (zánětlivé) a pozdní (regenerační) fázi hojení. PTX3 je důležitý pro adekvátní diferenciaci osteoblastů a správnou mineralizaci matrix. Diferenciace osteoblastů lze dosáhnout sekvestrováním FGF2 v extracelulární matrix nově remodelované kosti [147]. Při zánětu se však PTX3 chová jako mediátor, který podporuje úbytek kostní hmoty u zánětlivých kostních erozivních onemocnění [148].

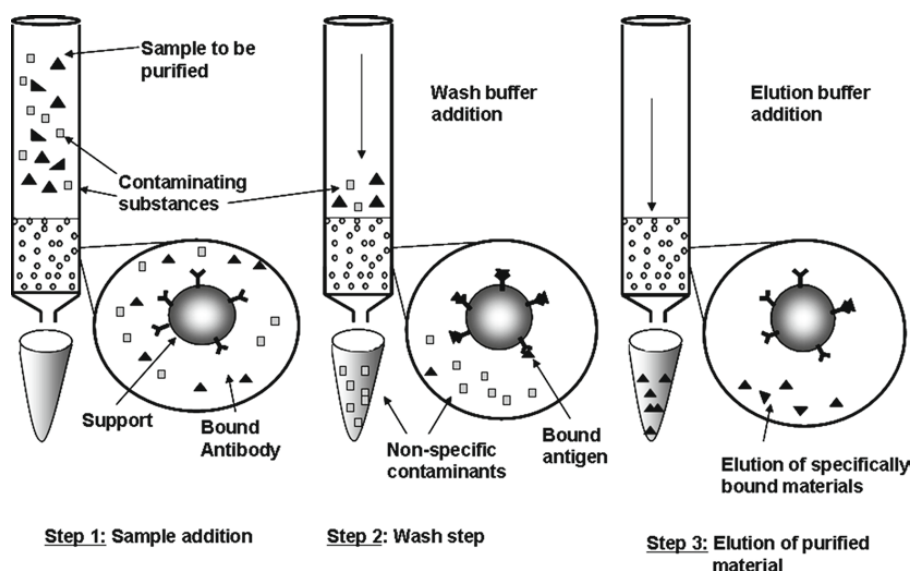
Angiogeneze je proces, při kterém se z vaskulárního endotelu tvoří nové krevní cévy. Hlavním angiogenním induktorem je FGF2, který podporuje buněčnou proliferaci, chemotaxi a přežití cévních buněk hladkého svalstva (dále jen SMC) *in vitro* a neovaskularizaci *in vivo*. Jak již bylo několikrát uvedeno PTX3 rozpoznává FGF2. Oba proteiny jsou produkovány cévními stěnami [65]. Díky přímé vazbě na FGF2, nadměrná exprese PTX3 v transdukovaných SMC, snižuje intimální hyperplazii poraněné cévy. Dále je FGF2 důležitý pro podporu angiogeneze, zánětu, aterosklerózy a růstu nádoru. U všech těchto procesů se kumulují makrofágy, které spolu s buňkami endotelu mohou představovat zdroj FGF2 a PTX3 [70].

## 1.4 IMUNOAFINITNÍ MAGNETICKÁ SEPARACE

Afinitní chromatografie je druh kapalinové separace využívající interakce ligand-receptor [149]. V případě magnetické separace tato vazba probíhá na povrchu magnetických částic, které mají chemicky modifikovaný povrch.

### 1.4.1 Princip metody

Imunoafinitní chromatografie (dále jen IAC) spojuje kapalinovou chromatografii se specifickou vazbou protilátky (dále jen Ab) a antigenu (dále jen Ag). Při IAC se stacionární fáze skládá z protilátek nebo protilátkám podobného činidla. Jedná se o podkategorii afinitní chromatografie, ve které je biologická spjitost mezi vázající složkou a cílovou sloučeninou [150]. Ab, schopná vazby se zájmovým Ag, je imobilizována na pevnou podložku, čímž vznikne aktivní imunosorbent. Směs proteinů je pak vedena do kolony skrz imunosorbent. Tam se cílový Ag vyváže na Ab a ostatní nežádoucí složky jsou z kolony vymyty. Vazba mezi Ag a Ab je vratná, a lze ji přerušit. Toho se využívá k eluci Ag z kolony. K narušení vazby dochází nejčastěji změnou podmínek, např. změna pH nebo teploty [151]. Postup vazby a eluce je vidět na Obrázku 17.



Obrázek 17: Základy imunoafinitní chromatografie, převzato z [152]

Imunoafinitní chromatografie se od imunoafinitní magnetické separace liší hlavně způsobem provedení. Protilátky nejsou ukotvené na membráně kolony, ale na povrchu magnetických částic.



Imunomagnetická separace využívá malé super-paramagnetické částice nebo kuličky pokryté protilátkami proti cílené molekule. Většina částic je paramagnetická, což znamená, že se stává magnetickou pouze v magnetickém poli, mimo něj svůj magnetismus ztrácí. To je důležité, protože pokud by částice zůstávali zmagnetizované docházelo by ke shlukování a tím k omezení jejich vazebné kapacity [153]. První magnetické částice byly vyrobeny z agarosa-polyakrylamidu, později se vyráběli z celulosy, škrobu, agarosy nebo dextranu s příměsí oxidu železito-železnatým. Dalším krokem byla výroba magnetických částic z methakrylátu, akrylátu nebo styrenu [154]. V dalších výzkumech vytvářely částice tak, že přírodní nebo syntetické polymery potahovaly magnetickými oxidy železa [155]. Většina z těchto částic však neměla jednotné magnetické vlastnosti, což bylo způsobené jejich rozdílnou velikostí [154]. Rozmach ve využívání magnetických částic byl zajištěn novou generací částic o jednotné velikosti připravenou Ugelstadem a dalšími. Každá částice obsahuje stejné množství magnetického materiálu a díky tomu mají stejnou odezvu na magnetické pole [155]. Jako vhodný tvar nosiče je sférická kulička s nepravidelným povrchem pro lepší vazbu ligandu a zvětšení aktivní plochy vazby [156].

S vývojem nových metod výroby magnetických částic se začaly připravovat částice s různými povrchovými modifikacemi. Tyto částice mají široké využití v různých imuno metodách [157]. Pro izolaci cílové molekuly, se používají magnetické nosiče s imobilizovanými afinitními ligandy nebo celé nosiče připravené z biopolymeru vykazujícího afinitu k cílové molekule. K takovým materiálům se řadí různé syntetické polymery, porézní sklo nebo magnetické částice na bázi anorganických magnetických materiálů, např. upravený oxid železa [156]. Kromě materiálu magnetické částice je dalším určujícím prvkem, jejím povrch, respektive jeho modifikace. Pro úspěšnou imunoafinitní magnetickou separaci, je nezbytná vazba ligandů na povrch magnetické částice. Studie ukázala, že proteiny se mohou vázat přímo na povrch magnetických částic bez předchozí úpravy jejich povrchu. Tato vazba probíhá za přítomnosti karbodiimidu a je možná díky hydroxylovým skupinám na povrchu nově připravených magnetických částic [158]. Dalším způsobem vazby proteinů je vazba přes epoxidovou skupinu na epoxidových částicích [159]. Magnetické částice lze využít k čištění proteinů s His značením. Jako chelatační ligand se zde používá imidodioctová kyselina nebo nitrilotrioctová kyselina. Nejčastějšími přechodnými kovovými ionty jsou  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  a  $Co^{2+}$  [160]. Následným krokem ve vazbě proteinů na magnetické částice byla jejich orientovaná imobilizace [161]. Orientovaná vazba protilátek byla vyzkoušena i na zlatem potažených magnetických částicích. Vazebná místa na jejich povrchu reagovala se třemi volnými thiol

na Fab' fragmentech protilátek anti-alkalické fosfatasy a vytvořila tak vazbu s požadovanou orientací [162].

### **1.4.2 Imunoafinitní magnetická separace vs kolonové techniky**

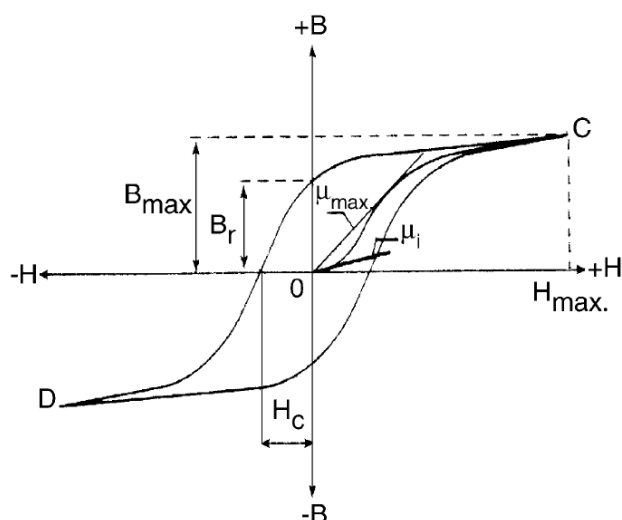
Magnetické nanočástice z oxidu železito-železnatého získaly značnou pozornost v biomedicínských a terapeutických oblastech. Díky jejich super-paramagnetickým vlastnostem, relativní chemické stabilitě a vlastní biokompatibilitě mají široké použití v biomedicínských aplikacích, např. sondy pro bakterie, podání léků, třídění buněk nebo separaci proteinů [163].

Samotné magnetické separační techniky se využívají v přípravě vzorků před samotnou analýzou. Následují většinou techniky jako kapalinová chromatografie, nebo spojené techniky jako je kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a další [164].

Výhoda afinitní magnetické separace spočívá v její rychlosti, bez potřeby drahých a velkých zařízení. Díky magnetickým silám se jedná o efektivní metodu separace, která je uživatelsky příjemná pro její jednoduchost a nenáročnost. Náklady na prostředí a chemikálie jsou výrazně nižší v porovnání s kolonovými technikami. Magnetické částice jsou komerčně dostupné v mnoha různých modifikacích. Nejčastěji s navázanými králičími, kozími nebo myšími monoklonálními protilátkami. Nevýhodou této metody je, že pro každý druh protilátek je nutné metodu modifikovat a optimalizovat podmínky vazby. Účinnost vazby může být snížena, a to kvůli nevhodné orientaci protilátek vázaných na povrchu magnetických částic [165].

### **1.4.3 Magnetické materiály a jejich vlastnosti**

Magnetické materiály se dají rozdělit na měkké magnety, tvrdé magnety a magnetické záznamové materiály a zařízení. Dělí se podle koercivity, respektive hysterezní křivky [166]. Každý materiál má svoji typickou hysterezní křivku. Na Obrázku 18. je zobrazena obecná hysterezní křivka. Z ní se dají odečíst hodnoty charakterizující daný materiál. Koercivní síla udává odolnost magnetu vůči odmagnetování [167].



Obrázek 18: Typická DC hysterezní křivka, převzato z [167]

Dále lze látky dělit podle toho, jak na ně působí magnetické pole. Jedná se o látky diamagnetické, paramagnetické a feromagnetické. Diamagnetické materiály mají velmi slabou magnetickou sílu [168]. Patří sem voda, diamant, proteiny, dřevo a další. Prvky s nejsilnějším diamagnetizmem jsou grafit a bismut [169]. Feromagnetismus je jedním z druhů paramagnetismu. Látky, s podobnými magnetickými vlastnostmi jako má železo jsou feromagnetické. Jedná se např. o nikl, kobalt nebo různé slitiny těchto tří prvků. Tyto látky mají feromagnetické i paramagnetické vlastnosti. K čistě paramagnetickým látkám patří mnoho solí železa, kovy palladia, platiny a další. Může se jednat o pevné, kapalné nebo plynné látky [170].

### **Tvrdé magnetické materiály a permanentní magnety**

Tvrdé magnetické materiály jsou definovány jako látky s vysokou koercivní silou [171]. Aby mohly být magnetické materiály označeny jako tvrdé, musí být jejich koercivita větší než  $10\,000\text{ A}\cdot\text{m}^{-1}$  [166]. Pokud mají i vysokou zbytkovou magnetizaci, dají se využívat jako permanentní magnetické materiály [171]. Základem pro dobrý materiál permanentního magnetu je vysoká magneto-krytalická anizotropie (závislost fyzikálních vlastností na směru ve kterém se šíří), která byla objevena v několika intermetalických sloučeninách vzácných zemin a kobaltu. Brzy bylo objeveno, že kombinace vyšších magnetických momentů železa a/nebo kobaltu s vyššími magnetickými momenty těžkých vzácných zemin, vedou k vysoké anizotropii [172]. K dalším prvkům využívaných při vývoji magnetů patří hliník, železo, nikl, nebo sloučeniny oxidů železa [173]. Během vývoje různých slitin, vykazovaly Al-Ni-Fe slitiny až devětkrát větší koercivitu než klasické wolframové oceli a dvaapůlkrát vyšší

koercivitu než kobaltová magnetická ocel. Po studiu slitiny Al-Ni-Fe byl přidán kobalt a vznikla tak slitina nazývaná Alnicos [174]. Nové magnetické materiály jsou založeny na bázi intermetalických sloučenin vzácných zemin, které ukazují vyšší koercivní sílu a hustotu energie než tradiční slitiny Al-Ni-Co a tvrdé ferity [172].

### **Měkké magnetické materiály**

Měkké feromagnetické materiály mají vysokou permeabilitu, nízkou koercivitu a nízkou ztrátu hystereze. Používají se k zesílení hustoty toku generovaného magnetickým polem [168.]. Měkké magnetické materiály se používají jako multiplikátor toku v široké škále zařízení, včetně transformátorů, generátorů, motorů a slouží ke generování, distribuci a přeměně elektrické energie [175].

Měkké magnetické amorfní slitiny se dají rozdělit do dvou skupin. První jsou slitiny na bázi železa s vysokou magnetickou saturací a druhou skupinou jsou slitiny na bázi kobaltu s vysokou efektivní permeabilitou. Vlastnosti měkkých magnetických látek jsou ovlivněny jejich složením a velikostí částic [176]. Ideálním měkkým magnetickým materiálem je izotropní médium s velmi vysokou magnetickou permeabilitou, nízkou koercivitou a vysokou indukcí nasycení [177]. Největším pokrokem ve vývoji měkkých magnetických materiálů byly amorfní a nanokrystalické slitiny [175].

Magnetické materiály používané pro záznamová zařízení jsou magnetorezistentní. Tyto materiály jsou schopny měnit hodnotu svého elektrického odporu v závislosti na okolním magnetickém poli [178].

#### **1.4.4 Magnetické materiály v klinické diagnostice**

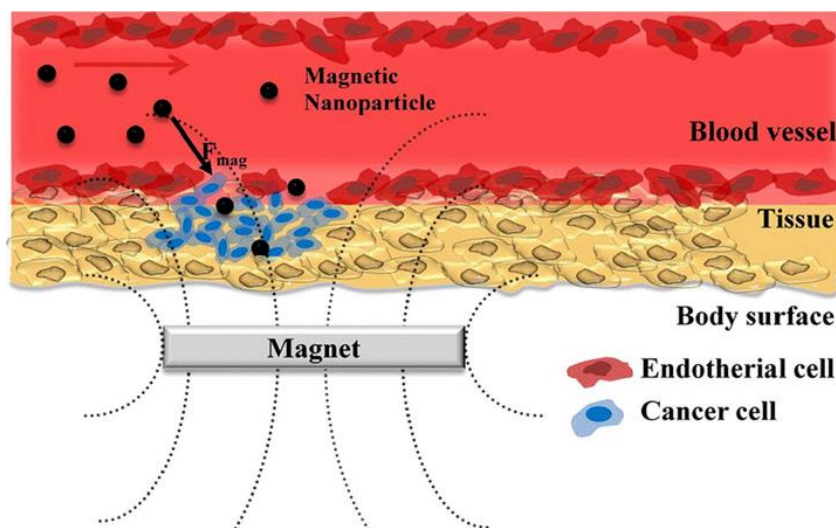
Nanočástice oxidů železa se řadí k feromagnetickým materiálům a používají se v různých biomedicínských a bioinženýrských aplikacích. K nanočásticím oxidu železa patří magnetit, maghemit a směsné ferity [179]. Mikro a nanometrové částice se používají pro distribuci léčiv v organismu [180]. Nanočástice oxidu železa se používají i při léčbě rakoviny (hyperthermia), dále se dají využít k separaci DNA, k imobilizaci proteinů nebo k separaci patogenů [181].

Superparamagnetické částice pokryté protilátkami vůči povrchovým antigenům jsou účinné pro izolaci eukaryotických buněk z tekutin, např. krev. Tato technika je vhodná i pro detekci eukaryotních organismů. Ke spojení mezi bakterií a nanočásticí může dojít dvěma

způsoby. Prvním je konjugace bakterie s protilátkou na povrchu nanočástice a tvorbou imunokomplexu, nebo nekovalentní elektrostatickou interakcí povrchu nanočástice s buněčnou stěnou mikroorganismu prostřednictvím aktivní skupiny [181]. Vzorčky částic se naočkují do kultivačních pěst, nebo na pevná média selektivní pro cílové bakterie. Identifikaci lze pak provést konvenčními metodami, např. přímá mikroskopie, kultivace nebo imunologické metody [182].

### Transport léčiv magnetickými nanočásticemi

Pro transport léčiv se využívají magnetické nanočástice nebo nanokapsle. Nanočásticemi se rozumí magnetický nosič s kovalentně vázaným léčivem na svém povrchu. Nanokapsle je označení vezikulárních systémů, kde je léčivo uzavřeno ve vodné nebo olejové dutině, nejčastěji připravenou reverzním micelovým postupem. Takto uzavřené léčivo je obklopeno organickou membránou (magnetoliposom), nebo je zapouzdřeno v duté anorganické tobolce [183]. Magnetické nanočástice musí splňovat určité parametry, např. dostatečnou velikost částice pro účinnou magnetizaci, schopnost kontrolované absorpce a uvolnění léčiva. Dlouhodobě cirkulující částice se také musí umět vyhnout odstranění fagocytárním systémem [184]. Aby byla distribuce léku úspěšná je nutné, aby byly částice magneticky aktivní pouze pod vlivem vnějšího magnetického pole.



Obrázek 19: Schéma distribuce léků za pomoci vnějšího magnetického pole, převzato z [185].

Distribuce léčiv pomocí magnetických nanočástic má potenciál v oblasti léčby rakoviny. Na rozdíl od klasické léčby, se magnetické nanočástice zaměří na konkrétní místo v organismu. Díky tomu snižují koncentraci léčiva na zdravé tkáně [186]. Komplexy nosič/léčivo jsou obvykle ve formě ferrofluidu a podávají se do oběhového systému pacienta.

Po vstupu komplexu do krevního řečiště je použito vnější vysoce gradientní magnetické pole ke zkoncentrování léčiva na místě určení, zobrazeno na Obrázku 19. V místě určení je pak léčivo uvolněno buď enzymatickou aktivitou, nebo změnami fyziologických podmínek, teplota, osmolalita a další [187]. Pro distribuci nanočástic v systému se musí optimalizovat jejich velikost a magnetická síla, aby se snížila nespecifická absorpce retikuloendotelovým systémem a prodloužila se doba oběhu v organismu [188]. V ideálním případě by si částice po odstranění magnetického pole neuchovaly žádnou magnetickou sílu a tím by se zabránilo jejich případné agregaci a usnadnilo se jejich vyloučení z organismu [185].

Při léčbě magnetickými nanočásticemi se bere ohled i na jejich biokompatibilitu a toxicitu. Biokompatibilita je spojena s odpovědí imunitního systému a s toxicitou vnitřního nosiče nebo jeho biodegradčních metabolitů. Z toxikologického hlediska by měl být nosič po uvolnění léčiva, co nejrychleji odstraněn z organismu. Odstranění však závisí na mnoha faktorech, jako je dávka částic, chemické složení, velikost, struktura, způsob podání, farmakokinetika a biodistribuce [183]. Při implantaci magnetických nanočástic hrozí riziko migrace a hromadění částic v různých tkáních či orgánech. Kumulace částic by mohla spustit imunologickou a zánětlivou reakci organismu [189].

## 2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této práce bylo vytvořit funkční imunosorbent pro záchyt proteinu PTX3 ze vzorků plodové vody a ověřit jeho účinnost pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

Jednotlivé úkoly byly:

1. Vazba modelových nespecifických protilátek na magnetické částice s odlišnou modifikací povrchu a porovnání jejich účinnosti vazby
2. Vazba modelových specifických protilátek na magnetické částice s odlišnou modifikací povrchu a porovnání jejich účinnosti vazby
3. Ověření funkčnosti vytvořených imunosorbentů použitím specifických proteinů proti navázaným protilátkám a ověření jejich účinnosti vazby
4. Příprava imunosorbentu se specifickými protilátkami proti rekombinantnímu proteinu PTX3

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY**

- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- automatické mikropipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- koncentrátor vakuový plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- magnetický separátor Dynal – MPC-S (Dynal Biotech, Oslo, Norsko)
- mikrostříkačka (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA)
- miniodstředivka (Fisher Scientific, Pardubice, Česká republika)
- odsolovací kolonky AMICON Ultra-0,5 ml, 100 K (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts)
- odsolovací kolonky AMICON Ultra-0,5 ml, 10K (Merck Milipore, Billerica, Massachusetts)
- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- rotátor RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů ChemiDoc™ XRS+ System s ImageLab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů G:BOX se softwarem GeneTools from SynGene (SynGene, Cambridge, Velká Británie)
- třepačka PSU-20i (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- vortex (Grant-bio, Cambridge, Velká Británie)
- zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Protein LoBind Tube 1,5 ml (Eppendorf tubes)

#### **3.2 POUŽÍVANÉ CHEMIKÁLIE**

- AgNO<sub>3</sub> (Lachmer, Neratovice, Česká republika)
- Akrylamid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)



- Barvicí roztok Coomassie Blue (Bio-Safe™ Coomassie Stain; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Deionizovaná voda
- DL-Glyceraldehyd (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Dodecylsulfát sodný – SDS (Serva, Heidelberg, Německo)
- Dimethylsulfoxid – DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid – EDAC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Ethanol 96% (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Ethylenglykol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Formaldehyd 38% (Penta, Chrudim, česká republika)
- Glutaraldehyd (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Glycin (Sima Aldrich, St. Louis, MO)
- HCl 36% (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Hydrazid-biotin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- KCl (Penta, Chrudim, Česká republika)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- Kyselina citrónová (LACHEMA a.s., Brno, Česká republika)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Standard molekulových hmotností (Marker Precision Plus Protein™ Unstained Standards; Bio-Rad, Hercule, CA, USA)
- 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina – MES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- N, N, N, N-tetramethylenethyldiamin –TEMED (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- N,N-methylenbisakrylamid (Serva, Heidelberg, Německo)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- NaCl (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (Lachner, Neratovice, Česká republika)
- NaIO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- NaOH (Penta, Chrudim, Česká Republika)
- Persíran amonný (Lachema; Chemapol)
- N-hydroxysulfosukcinimid sodný, - S-NHS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Trifluoroctová kyselina – TFA (Acros Organics, Geel, Belgie)

- Tris (hydroxymethyl) aminomethan – TRIS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO; Roche)
- Vodný roztok amoniaku 25-29% (Penta, Chrudim, Česká republika)

### 3.2.1 Typy nosičů

- Magnetické částice modifikované proteinem A – PURE PROTEOM™ PROTEIN A (1,5-2,5μg/μl vazebná kapacita (králičí IgG), Milipore Corp., Billerica, MA, USA)
- Magnetické částice modifikované streptavidinem – DYNABEAD™ MY ONE™ STREPTAVIDIN C1 (10mg/1ml; vazba >2,5 pmol protilátky/mg částic; ThermoFisher; Waltham, MA, USA)
- Magnetické částice s COOH funkční skupinou – DYNABEADS MYONE CARBOXYLIC ACID (Invitrogen, ThermoFisher; Waltham, MA, USA)
- Magnetické částice s COOH funkční skupinou – SiMAG Carboxyl (10mg/1ml; Chemicell; berlín, Německo)
- Magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou – HEMA-40% *co*-EDMA-NHNH<sub>2</sub> (1mg/45,9μl)
- Magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou – SiMAG Hydrazide (1mg/20μl; Chemicell; Berlín, Německo)

### 3.2.2 Použité antigeny a jejich protilátky

- Lyofilizované nespecifické IgG z lidského séra (5 mg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Lyofilizované nespecifické IgG z lidského séra (1 mg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, MO)
- Monoklonální myší protilátky proti lidskému proteinu nadvarlat 4 (HE4) (5,2 mg/ml; MAb 2B13; HYTEST; Turku, Finsko)
- Monoklonální protilátky PTX3 (M01), klon 5B7 (Taipei, Taiwan)
- Polyklonální králičí protilátky proti lidskému proteinu PTX3 (LS-C804485; LSBio; Seattle, WA)
- Rekombinantní lidský protein PTX3 (host E. coli; Abbexa; Cambridge, Velká Británie)
- Rekombinantní lidský protein HE4 (20μg/80μl; WFDC2, Sino Biological Inc., Peking, Čína)

### 3.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

6M HCl: Do odměrné zkumavky se odměří 23,5 ml destilované vody, k ní se opatrně přilije 26,5 ml 35% HCl.

#### **Roztoky pro SDS-PAGE**

Roztok A: 11,68 g akrylamidu a 0,32 g bisakrylamidu se rozpustí ve 12 ml destilované vody a nechá se 30 minut třepat. Po úplném rozpuštění se objem roztoku doplní na 40 ml.

Roztok B: 7,26 g TRIS se doplní na 40 ml destilovanou vodou. K roztoku se postupně přikapává 6M HCl pro dosažení požadované hodnoty pH 8,8.

Roztok C: 4,84 g TRIS se doplní na 40 ml destilovanou vodou. K roztoku se postupně přikapává 6M HCl pro dosažení požadované hodnoty pH 6,8.

Roztok D: 1 g SDS se rozpustí v 10 ml destilované vody.

Roztok E: 0,1 g persíranu amonného se rozpustí v 1 ml destilované vody.

Elektrodotový pufr: 3,03 g TRIS, 1 g SDS a 14,4 g glycinu se rozpustí a doplní na objem 1 l destilovanou vodou.

Elektrodotový pufr 10x koncentrováno: 30,3 g TRIS, 10 g SDS a 144 g glycinu se rozpustí a doplní na objem 1 l destilovanou vodou.

#### **Roztoky pro barvení amoniakálním stříbrem:**

Fixační roztok: 50 ml ledové kyseliny octové, 500 ml ethanolu se smíchá a doplní destilovanou vodou na objem 1 l.

10% roztok glutaraldehydu: 20 ml 50% glutaraldehydu se doplní na 100 ml destilovanou vodou.

Roztok amoniakálního stříbra: Do Erlenmayerovy baňky se odměří 21 ml destilované vody, 1,4 ml vodného roztoku amoniaku, 239  $\mu$ l 9M NaOH. K tomu se přikapává roztok 20%  $\text{AgNO}_3$  do vzniku světle hnědého zabarvení (bod ekvivalence). Výsledný roztok se doplní na 100 ml destilovanou vodou.

Vyvolávací roztok: 250 mg kyseliny citrónové se spolu s 540  $\mu$ l 37% formaldehydu rozpustí v 500 ml destilované vody.

Ustalovací roztok: 50 ml ledové kyseliny octové se doplní na 1 l destilovanou vodou.

**Roztoky pro imobilizaci protilátek na magnetických částicích SiMAG-Carboxyl s S-NHS; DYNABEADS s COOH funkční skupinou s S-NHS:**

Vazebný roztok – 0,1M MES pufr pH 5,0: V 50 ml destilované vody se rozpustí 0,976 g MES. Pro získání požadovaného pH se k roztoku přikapává 1M NaOH.

Promývací roztok – PBS pufr pH 7,4: 0,0203 g KCl, 0,0207g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,8004 g NaCl a 0,2901 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se rozpustí v 100 ml destilované vody.

Skladovací roztok – PBS pufr pH 7,4 s 0,05% Tween: 0,12 g NaCl, 0,003 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0435 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,003 g KCl se rozpustí v 15 ml destilované vody. Ke vzniklému roztoku se přidá 0,03 ml 25% Tween.

**Roztoky pro imobilizaci protilátek na magnetických částicích SiMAG-Hydrazide; HEMA – 40% *co*-EDMA-HNHN<sub>2</sub> :**

Oxidační činidlo – 0,2M roztok NaIO<sub>4</sub>: Navážka NaIO<sub>4</sub> se rozpustí v požadovaném objemu destilované vody. Vždy se připravuje čerstvý.

Promývací a vazebný roztok – 0,1M fosfátový pufr pH 7,0: Podle požadovaného objemu se připraví 0,1M roztoky NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O.

Blokační roztok – 0,1M DL-glyceraldehyd ve vazebném roztoku: 9 mg DL-glyceraldehydu se rozpustí v 1 ml vazebného pufru.

Promývací roztok po blokaci – PBS pufr pH 7,4: 0,0203 g KCl, 0,0207g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,8004 g NaCl a 0,2901 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> se rozpustí v 100 ml destilované vody.

Skladovací roztok – PBS pufr pH 7,4 s 0,05% Tween: PBS pufr pH 7,4 s 0,05% Tween: 0,12 g NaCl, 0,003 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0435 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,003 g KCl se rozpustí v 15 ml destilované vody. Ke vzniklému roztoku se přidá 0,03 ml 25% Tween.

**Roztoky pro izolaci a vazbu hIgG na mag. částicích modifikovaných proteinem A**

Ekvilibrační pufr – 0,1M fosfátový pufr pH 8,0 s 0,15M NaCl: Podle požadovaného objemu se připraví 0,1 M roztoky NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O. Do takto připraveného roztoku se přidá navážená NaCl.

Eluční pufr – 0,1M glycinový pufr pH 2,8 s 0,15M NaCl: Navážka glycinu se rozpustí v destilované vodě, pomocí 6M HCl se upraví pH pufru na požadovanou hodnotu 2,8. Po upravení pH se k roztoku přidá NaCl.

Roztok pro úpravu pH elučních frakcí – 0,1M TRIS-HCl pufr pH 9,5: Navážku TRIS rozpustíme v destilované vodě. Pomocí 6M HCl upravíme pH roztoku na požadovanou hodnotu pH 9,5.

Regenerační roztok – 0,1M kyselina citrónová pH 3,0: Navážku kyseliny citrónové rozpustíme v destilované vodě. Pomocí 1M NaOH upravíme pH roztoku na požadovanou hodnotu pH 3,0.

Vazebný pufr – 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl: Podle požadovaného objemu se připraví 0,1M roztoky  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Do takto připraveného roztoku se přidá NaCl.

### **Roztoky pro biotinylací protilátek**

Oxidační činidlo – 0,2M  $\text{NaIO}_4$  v 0,1M fosfátovém pufru pH 7,2 s 0,15M NaCl. Navážka  $\text{NaIO}_4$  se rozpustí v požadovaném objemu pufru. Vždy se připravuje čerstvý.

0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl: Podle požadovaného objemu se připraví 0,1M roztoky  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Do takto připraveného roztoku se přidá NaCl.

### **Roztoky pro izolaci a vazbu biotinylovaných hIgG na mag. Částicích modifikovaných streptavidinem**

PBS pufr pH 7,4: 0,0203 g KCl, 0,0207g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,8004 g NaCl a 0,2901 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  se rozpustí v 100 ml destilované vody.

### **Roztoky pro ověření funkčnosti připravených imunosorbentů s imobilizovanými protilátkami pomocí imunokomplexu:**

Promývací roztoky:

0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 0,2M NaCl: Podle požadovaného objemu se připraví 0,1M roztoky  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Do takto připraveného roztoku se přidá NaCl.

0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 1M NaCl: Podle požadovaného objemu se připraví 0,1M roztoky  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Do takto připraveného roztoku se přidá NaCl.

10mM fosfátový pufr pH 7,0: Z 0,1M fosfátového pufru pH 7,0 se odebere 1 ml a doplní se na objem 10 ml destilovanou vodou.

Eluční roztoky:

0,05% Trifluoroctová kyselina: Pro přípravu 6 ml 0,05% roztoku se 3  $\mu$ l 100% TFA doplní na 6 ml destilovanou vodou.

0,1M vodný roztok amoniaku: Pro přípravu 2 ml 0,1M vodného roztoku amoniaku se 30,81  $\mu$ l 25% roztoku amoniaku doplní na 2 ml destilovanou vodou.

### **3.4 DISKONTINUÁLNÍ POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA V PROSTŘEDÍ DODECYLSULFÁTU SODNÉHO (SDS- PAGE)**

**Roztoky:**

- Roztok A – 30% směs akrylamidu a bisakrylamidu
- Roztok B – 1,5M TRIS-HCl pufr pH 8,8
- Roztok C – 1,0M TRIS-HCl pufr pH 6,8
- Roztok D – 10% roztok SDS
- Roztok E – 10% persíran amonný
- Roztok G – 100mM Tris.HCl pufr 6,8 s 4% SDS, 20% glycerol, 0,2% bromfenolová modř
- Elektrodový pufr – 0,025M Tris, 0,192M glycin a 0,1% SDS pH 8,3 –8,6

**Pracovní postup:**

Elektroforetická aparatura a skla se očistí a odmastí pomocí ethanolu. Spodní strana skel uzavřených do svorek se zajistí nataženým kouskem parafilmu. Skla se zafixují do stojanu na přípravu gelu.

Dále se připraví dělicí gel, jeho koncentrace se zvolí podle separované látky. Do uzavíratelné zkumavky se podle Tabulky napipetuje deionizovaná voda, roztok A, B, D a TEMED. Zkumavka se uzavře a velmi opatrně se promíchá její obsah. Nakonec se k roztoku přidá roztok E. Zkumavka se znovu uzavře, obsah se opatrně promíchá a ihned napipetuje do

připravených skel. Roztok pipetujeme do výšky 2-2,5 cm od vrchního okraje menšího skla. Po napipetování roztok převrstvíme deionizovanou vodou. Gel zpolymeruje během 20-30 minut.

Během tuhnutí se připraví roztok zaostřovacího gelu podle Tabulky č.3. Nejprve se pomocí filtračního papíru odsaje voda nad dělicím gelem. Do uzavíratelné zkumavky napipetujeme deionizovanou vodu, roztoky A, C, D a TEMED, zkumavka se uzavře opatrně promíchá a k roztoku se přidá roztok E. Obsah ve zkumavce se promíchá pipetou a ihned se pipetuje mezi skla, kde byla mezitím odsáta voda. Pipetuje se po vrchní hranu menšího skla. Do mezery mezi skly se vloží odmaštěný hřebínek na tvorbu jamek a gel se nechá ztuhnout. Celá práce probíhá v rukavicích a v prostorách digestoře.

Po ztuhnutí se gely přenesou do elektroforetické vany, kde je vyndán hřebínek a jamky jsou 3x propláchnuty elektrodoým pufrem.

Vzorky pro SDS-PAGE se připraví smícháním příslušného vzorku a roztoku G v poměru 1:1. Směs se 3 minuty povaří v termobloku při 100 °C. Následně se vzorky napipetují do propláchnutých jamek a gel se zalije elektrodoým pufrem. Po vyznačené rysky se do elektroforetické vany nalije elektrodoý pufr a vana se uzavře víkem. Následně se elektroforetická vana připojí ke zdroji napětí a nechá se probíhat elektroforéza. Na zdroji se navolí napětí o 180 V a proud 30mA pro každý z gelů. Po ukončení elektroforézy je gel opatrně uvolněn z dělicích skel pomocí proudu destilované vody a přenesen do Petriho misky. Gel je nadále uchováván v destilované vodě nebo fixačním roztoku.

Tabulka 3: Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE

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

### 3.4.1 Barvení gelů

#### Barvení roztokem amoniakálního stříbra

##### Roztoky:

- Fixační roztok – 5% kyselina octová a 50% ethanol
- 10% roztok glutaraldehydu
- Roztok amoniakálního stříbra – 20% AgNO<sub>3</sub>, 9M NaOH a vodný roztok amoniaku
- Vyvolávací roztok – 0,05% kyselina citrónová a 0,04% formaldehyd
- Ustalovací roztok – 5% kyselina octová

##### Pracovní postup:

Po vlastním elektroforetickém dělení se gel propláchne vodou a fixuje se ve fixačním roztoku přes noc při 4 °C nebo 1 hodinu při laboratorní teplotě za mírného míchání. Po fixaci se gel rehydratuje v destilované vodě po dobu 30 minut. Po rehydrataci se gel inkubuje 30 minut v 10% roztoku glutaraldehydu při laboratorní teplotě. Dále se gel promývá destilovanou vodou (6x10 minut). Po promytí se gel inkubuje v roztoku amoniakálního stříbra po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci se gel propláchne destilovanou vodou a přenesse se do vyvolávacího roztoku. Po vyvolání se gel přenesse do ustalovacího roztoku.

#### Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue

##### Roztoky:

- Roztok pro obarvení gelu: komerční roztok pro barvení: Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Roztok pro odbarvení gelu: deionizovaná voda

##### Pracovní postup:

Po vlastním elektroforetickém dělení se gel přenesse do Petriho misky a 3x se propláchne destilovanou vodou. Následně se gel fixuje 1 hodinu ve fixačním roztoku. Po skončení fixace se gel převrství barvicím roztokem a inkubuje se při teplotě 4°C pře noc. Po skončení inkubace se barvicí roztok slije do připravené nádoby. Ke gelu se přilije odbarvovací roztok a podle potřeby se vyměňuje do odbarvení pozadí gelu.



### 3.5 IMOBILIZACE IGG NA MAGNETICKÝCH ČÁSTICÍCH S KARBOXYLOVOU FUNKČNÍ SKUPINOU A S PŘÍDAVKEM SNHS

#### Roztoky:

- Promývací pufr č. 1 – 0,1M MES pufr pH 5,0
- Promývací pufr č. 2 – PBS pH pufr 7,4
- Skladovací pufr – PBS pH pufr 7,4

#### Pracovní postup:

Imobilizace využívá dvoukrokové karboimidové metody imobilizace. 1 mg magnetických částic se promyje 5 x 1,5 ml promývacím pufrem č. 1. K promytým částicím se přidá 7,5 mg EDAC a 1,25 mg SNHS rozpuštěných v 500  $\mu$ l 0,1 M MES pH 5,0. Magnetické částice (DYNABEADS CARBOXILIC ACID, SiMag Carboxyl) se inkubují 10 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Připraví se roztok protilátek. Do 1 ml promývacího pufru č. 1 jsou přidány protilátky. Z tohoto roztoku protilátek se odebere 10  $\mu$ l pro kontrolu na SDS-PAGE. Dále se nosič promyje 2 x 1,5 ml promývacím pufrem č. 1 a je k němu přidán roztok protilátek. Následuje imobilizace po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Po ukončení inkubace je nosič promyt 5 x 1,5 ml promývacího pufru č. 2 a uskladněn při teplotě 4 °C. Promývací frakce se uschovají pro kontrolu na SDS PAGE.

### 3.6 VAZBA IGG NA MAGNETICKÉ ČÁSTICE S HYDRAZIDOVOU FUNKČNÍ SKUPINOU

#### Roztoky:

- Oxidační činidlo – 0,02M roztok NaIO<sub>4</sub> (vždy čerstvý)
- Promývací a vazebný pufr – 0,1M fosfátový pufr pH 7,0
- Blokační roztok – 0,1M DL-glyceraldehyd ve vazebném roztoku
- Promývací pufr po blokaci – PBS pufr pH 7,4
- Skladovací pufr – PBS pufr pH 7,4

#### Pracovní postup:

K roztoku protilátek se přidá NaIO<sub>4</sub> v takovém množství, aby výsledný roztok o objemu 500  $\mu$ l měl koncentraci 0,02 M NaIO<sub>4</sub>. Směs se nechá inkubovat 30 minut při laboratorní

teplotě za mírného otáčení ve tmě. Po skončení inkubace se oxidace zastaví přidáním 1,5 µl ethylenglykolu a důkladně se promíchá v celém objemu zkumavky. Následuje 10-ti minutová inkubace při laboratorní teplotě ve tmě. Odstranění nezreagovaného činidla se provede přes MicroSpin™ G-25 kolonky, postupuje se dle návodu k přístroji. Odsolený roztok protilátek se převede do 1 ml vazebného pufru. Z tohoto roztoku se odebere 10 µl pro kontrolu na SDS-PAGE.

1 mg magnetických částic se promyje 5 x 1,5 ml 0,1M fosfátovým pufrem pH 7,0. K takto promytým částicím se přidá roztok zoxidovaných protilátek. Magnetické částice (SiMag Hydrazide; HEMA 40% *co*-EDMA NHH<sub>2</sub>) se imobilizují přes noc při teplotě 4 °C za mírného otáčení. Po ukončení imobilizace se magnetické částice 3 x 1 ml promyjí příslušným promývacím roztokem a vazebná frakce spolu promývacími frakcemi se uschová pro kontrolu na SDS PAGE. Roztok se dále promyje ještě 2 x 1,5 ml příslušným promývacím roztokem. Dále se provede blokace a to přidavkem 500 µl blokačního roztoku a následnou inkubací 1 hodinu při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Následně se nosič promyje 3 x 1,5 ml příslušným promývacím roztokem, 3 x 1,5 ml PBS pufru pH 7,4 a uskladní se ve skladovacím roztoku.

### **3.7 OVĚŘENÍ FUNKČNOSTI PŘIPRAVENÝCH IMUNOSORBENTŮ S IMOBILIZOVANÝMI PROTILÁTKAMI POMOCÍ IMUNOKOMPLEXU**

#### **Roztoky:**

- Ekvilibrační a vazebný pufr – 0,1M fosfátový pufr pH 7,0
- Promývací pufr č. 1 – 0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 0,2 M NaCl
- Promývací pufr č. 2 – 0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 1 M NaCl
- Promývací pufr č. 3 – 10mM fosfátový pufr pH 7,0
- Eluční roztok – 0,05% TFA pH 2,3
- Eluční roztok – 0,1M vodný roztok amoniaku pH 11,1

#### **Postup:**

Imunosorbent (1 mg nosiče s navázanými protilátkami) se promyje 4 x 1 ml 0,1M fosfátového pufru pH 7,0. K promytému nosiči se přidá 10 µg proteinu odpovídající specifity a reakční objem se doplní na 500 µl pomocí vazebného 0,1M fosfátového pufru pH 7,0.

Z roztoku se odebere 10  $\mu$ l pro kontrolu na SDS-PAGE. Nosič se se směsí inkubuje 1,5 hodiny při mírném otáčení při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace se odebere supernatant, jako vazebná frakce a nosič se promyje 8 x 1 ml promývacím pufrem č. 1. Během promývání se první tři promývací frakce uschovají pro kontrolu. Dále se promývá 3 x 1 ml promývacím pufrem č. 2. Zde se pro kontrolu, uschová první promývací frakce. Následně se nosič promyje 3x1 ml promývacím pufrem č. 3.

Nosič se promíchá a rozdělí se do dvou zkumavek, tak aby v každé bylo 500  $\mu$ g nosiče. První podíl se eluuje 3 x 200  $\mu$ l 0,05% TFA a druhý podíl se eluuje 200  $\mu$ l 0,1M vodným roztokem amoniaku. Eluce probíhá 15 minut při mírném otáčení za laboratorní teploty. Po skončení kyselé eluce se nosič promyje 2 x 1 ml 0,05% TFA a 5 x 1 ml 0,1M fosfátovým pufrem pH 7,0. Nosič ze zásadité eluce se promyje 5 x 1 ml 0,1M fosfátovým pufrem pH 7,0. oba nosiče se uskladní při teplotě 4 °C.

Získané eluce se zakoncentrují ve vakuovém koncentrátoru na peletku proteinů a regenerují se v 10  $\mu$ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,0. Nebo se eluce zakoncentrují na AMICON filtrech 100K/10K na objem 40  $\mu$ l. Stupeň zakoncentrování byl poté zohledněn při výpočtu izolovaných proteinů. Zakoncentrované eluce se použijí pro kontrolu účinnosti eluce na SDS-PAGE.

### **3.8 VAZBA IGG NA MAGNETICKÉ ČÁSTICE MODIFIKOVANÉ PROTEINEM A JEJICH STABILIZACE POMOCÍ S-NHS**

#### **Roztoky:**

- Vazebný a promývací pufr – 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl
- Síťovadlo – 2,5  $\mu$ M S-NHS
- Zásobní roztok hIgG (1 mg/ml)

Ze zásobního roztoku magnetických částic (PureProteom™ Protein A Magnetic beads) se odebralo 100  $\mu$ l sterilní špičkou do zkumavky. Částice se promyly 3 x 250  $\mu$ l 0,1M fosfátového pufru pH 7,2 s 0,15M NaCl. Připraví se roztok protilátek o celkovém objemu 250  $\mu$ l. 50  $\mu$ l hIgG se smíchá s 200  $\mu$ l fosfátového pufru. Z tohoto roztoku se odebere 10  $\mu$ l pro kontrolu na SDS-PAGE jako původní vzorek. Po přidání

roztoku hIgG k magnetickým částicím se částice inkubují 1 h při laboratorní teplotě za mírného otáčení.

Po inkubaci se odebere vazebná frakce. Částice se promyjí 5 x 250 µl fosfátového pufru. První tři promývací frakce se uschovají pro kontrolu vazby na SDS-PAGE. Po promytí se k magnetickým částicím přidá 250 µl 2,5 µM S-NHS. Po přidavku S-NHS se částice inkubují 1 h při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Po skončení inkubace se magnetické částice promyjí 5 x 250 µl fosfátového pufru. První dvě frakce se uschovají pro kontrolu na SDS-PAGE.

### **3.9 OXIDACE PROTILÁTEK $\text{NaIO}_4$ A JEJICH BIOTINYLACE POMOCÍ HYDRAZID-BIOTIN**

#### **Roztoky:**

- $\text{NaIO}_4$  v 0,1M fosfátovém pufru pH 7,2 s 0,15M NaCl
- 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl
- Zásobní roztok hIgG (1mg/ml)
- Biotinylační činidlo: 10 mM Hydrazid-biotin v dimethylsulfoxidu

#### **Pracovní postup:**

K oxidaci a biotinylaci se použije 100 µg hIgG. Roztok  $\text{NaIO}_4$  se promíchá a následně se odpipetuje 400 µl roztoku  $\text{NaIO}_4$  a přidá se k němu 100 µl hIgG ze zásobního roztoku. Výsledný roztok je 0,02M  $\text{NaIO}_4$ . Roztok se nechá 30 minut inkubovat ve tmě, při laboratorní teplotě, za mírného otáčení. Po skončení inkubace se zastaví oxidace přidáním 1,5 µl ethylenglykolu. Roztok se důkladně promíchá a nechá se znovu inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení a ve tmě. Po skončení inkubace se roztok protilátek odsolí na Amicon filtrech. Práce s kolonkami se provádí v rukavicích. Do zkumavky se vloží filtr, do něj se napipetuje celý objem roztoku protilátek a stočí se při 13 000 otáčkách (11 739 x g) 10 minut. Po skončení se vyjme filtr, obráceně se vloží do nové zkumavky a znovu se stočí, tentokrát při 3 500 otáčkách (3160 x g) 2 minuty. Po odsolení se získaný objem protilátek doplní 200 µl fosfátového pufru.

Připraví se zásobní roztok Hydrazid-biotin o 50mM koncentraci. Navážka se rozpustí ve 100  $\mu$ l DMSO. Z tohoto roztoku se odpipetuje 10  $\mu$ l do 200  $\mu$ l roztoku zoxidovaných protilátek, aby se získal roztok o koncentraci 5mM Hydrazid-biotin. Roztok protilátek s Hydrazid-biotinem se nechá inkubovat 1 hodinu a 15 minut při laboratorní teplotě ve tmě za mírného otáčení. Po skončení inkubace se k roztoku přidá 2  $\mu$ l NaCNBH<sub>3</sub> (práce se provádí v digestoři a v rukavicích). Roztok se promíchá a inkubuje se 30minut ve tmě při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Po skončení se roztok odsolí (postup odsolování viz oxidace protilátek) a odsolený koncentrát se převede do 200  $\mu$ l fosfátového pufru.

### **3.10 VAZBA BIOTINYLOVANÝCH PROTILÁTEK IGG NA MAGNETICKÉ ČÁSTICE MODIFIKOVANÉ STREPTAVIDINEM**

#### **Roztoky:**

- PBS pufr pH 7,4

#### **Pracovní postup:**

Ze zásobního roztoku magnetických částic (Dynabeads<sup>TM</sup> MyOne<sup>TM</sup> Streptavidin C1) se odebralo 100  $\mu$ l. Částice se promyjí 3x1 ml PBS pufru pH 7,4. 20  $\mu$ g biotinylovaných protilátek se doplní na 1 ml PBS pufrém pH 7,4 a z tohoto roztoku se odebere frakce pro kontrolu na SDS-PAGE. Roztok protilátek se přidá k promytému nosiči. Nosič se inkubuje 30 minut ve tmě, při laboratorní teplotě za mírného otáčení. Po skončení inkubace se odebere vazebná frakce a uschová se pro kontrolu na SDS-PAGE. Nosič se promyje 5x1 ml PBS pufru a všechny promývací frakce se uschovají pro kontrolu na SDS-PAGE. Nosič se skladuje v PBS pufru pH 7,4 při 4 °C.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo připravit a ověřit funkčnost imunosorbentu pro vazbu PTX3. Další část práce uvedená v zadání a týkající se IL-6 nebyla z důvodu kovidových omezení realizována. Omezení se týkala zákazu vstupu studentů do laboratoří v době nouzového stavu, výrazně opožděným dodávkám chemikálií, reagensů od zahraničních dodavatelů, problémy s proclením některých produktů nakoupených v zahraničí

První experimenty se prováděly na modelovém systému protilátek a jim specifických antigenech. Mj. to byly lidské IgG molekuly izolované ze séra zdravých dárců (komerčně dostupné) a dále specifické protilátky anti-HE4 a k tomu příslušný antigen.

Po zhodnocení výsledků experimentů s modelovými reagensy se přistoupilo k přípravě imunosorbentu, kde byly navázány anti-PTX3 protilátky a jejich vazebná aktivita byla ověřena pomocí rekombinantního proteinu PTX3.

### 4.1 PŘÍPRAVA IMUNOSORBENTŮ S RŮZNÝMI TYPY VAZBY S NESPECIFICKÝMI IGG

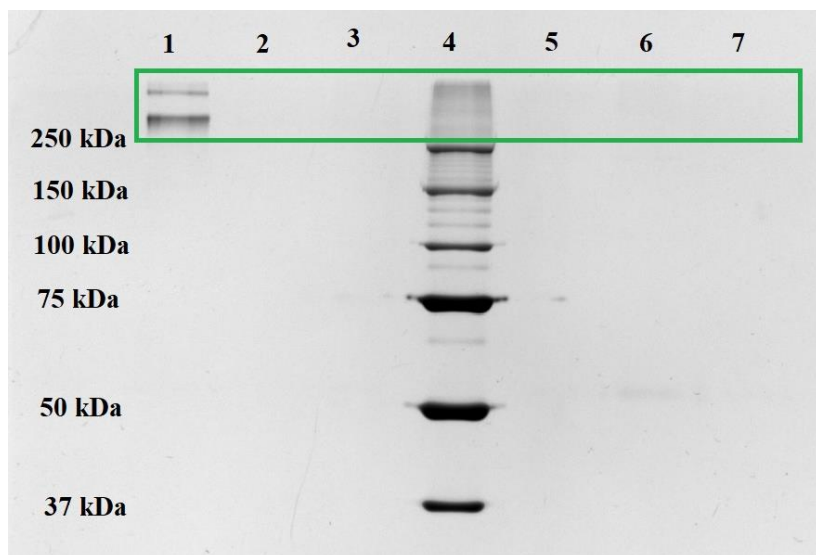
K vazbě byly použity čtyři typy magnetických nosičů:

- Magnetické částice modifikované proteinem A – PURE PROTEOM™ PROTEIN A (1,5-2,5μg/μl vazebná kapacita (králičí IgG), Milipore Corp., Billerica, MA, USA)
- Magnetické částice modifikované streptavidinem – DYNABEAD™ MY ONE™ STREPTAVIDIN C1 (10mg/1ml; vazba >2,5 pmol protilátky/mg částic; ThermoFisher; Waltham, MA, USA)
- Magnetické částice s COOH funkční skupinou – DYNABEADS MYONE CARBOXILIC ACID (Invitrogen, ThermoFisher; Waltham, MA, USA)
- Magnetické částice s COOH funkční skupinou – SiMAG Carboxyl (10mg/1ml; Chemicell; berlín, Německo)
- Magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou – HEMA-40% *co*-EDMA-NHNH<sub>2</sub> (1mg/45,9μl)
- Magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou – SiMAG Hydrazide (1mg/20μl; Chemicell; Berlín, Německo)

#### 4.1.1 Vazba nespecifických IgG na magnetické částice s COOH funkční skupinou

První zvolený nosič byly magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou. Vazba protilátek na povrch magnetických částic probíhala standardní dvoukrokovou karbodiimidovou metodou s přidavkem S-NHS, jako síťovadlem [190]. V prvním kroku se aktivuje karboxylová funkční skupina na povrchu magnetických částic přidáním EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid a S-NHS. V prvním kroku dojde ke vzniku esterového meziprojektu. Ve druhém kroku meziprojekt reaguje s aminovou funkční skupinou na proteinu za vzniku amidové vazby. Vazba protilátek na magnetické částice byla provedena podle pracovního postupu popsáno v kapitole 3.5.

Pro vazbu nespecifických lidských IgG (hIgG) byl použit 1 mg nosiče magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou (DYNABEADS). Na něj se vázalo 50  $\mu$ g hIgG. Kontrola vazby proběhla na SDS-PAGE. Výsledný gel se barvil roztokem amoniakálního stříbra. Na gel byl dávkován původní vzorek (0,5  $\mu$ g na jamku), vazebná a promývací frakce. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS+System se softwarem ImageLab<sup>TM</sup>. Záznam gelu po obarvení je na Obrázku 20. Frakce byly na gel nanášeny bez předchozího zakoncentrování. Na gelu, v dráze č. 1 je viditelný proužek odpovídající původnímu vzorku lidského IgG. Ve drahách č. 3, 5-7 nejsou vidět žádné proužky odpovídající hIgG. Vazba hIgG proběhla s účinností 100 %.



Obrázek 20: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby hIgG na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (DYNABEADS)

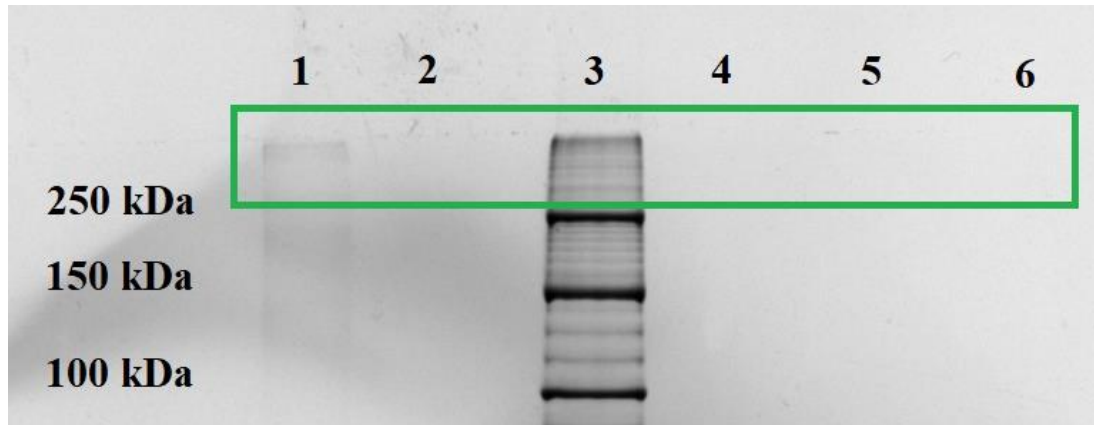
1 – nespecifické hIgG (0,5  $\mu$ g na jamku), 2 – vazebná frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 3 – 1. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), 4 – standard molekulových hmotností, 5 – 2. promývací frakce, 6 – 3. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), 7 – 4. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4); polyarylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

#### 4.1.2 Vazba nespecifických IgG na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou

Druhým typem nosiče byly magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou. Na volných karbohydrátových řetězcích se oxidací vytvoří aldehydické skupiny. Ty následně reagují s hydrazidem za tvorby hydrazinové kovalentní vazby [190].

K oxidaci protilátek se použil  $\text{NaIO}_4$ . Vazba protilátek na magnetické částice probíhala podle pracovního postupu popsaného v kapitole 3.6.

Pro vazbu nespecifických hIgG, byl použit 1 mg magnetických částic s hydrazidovou funkční skupinou (*co*-EDMA-NHNH<sub>2</sub>). Na nosič se vážalo 50  $\mu\text{g}$  hIgG (0,5  $\mu\text{g}$  na jamku,). Kontrola vazby se prováděla na SDS-PAGE a výsledný gel se barvil roztokem amoniakálního stříbra. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Záznam gelu po SDS-PAGE je ukázán na Obrázku 21. Na gelu v dráze č. 1 je patrný proužek patřící původnímu vzorku nespecifických hIgG. V drahách pro vazebnou a promývací frakci nejsou žádné další proužky patrné. To značí, že vazba hIgG proběhla ze 100 %. Frakce byly na gel nanášeny bez předchozího zakoncentrování.



Obrázek 21: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby nespecifických hIgG na magnetické částice HEMA 40%-*co*-EDMA-NHNH<sub>2</sub>

1 – nespecifické hIgG (0,5  $\mu\text{g}$  na jamku), 2 – vazebná frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0), 3 – standard molekulových hmotností, 4 – 1 promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0), 5 – 2. promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0), 6 – 3. promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0); polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.



### 4.1.3 Vazba nescifických IgG na magnetické částice modifikované proteinem A a stabilizované S-NHS

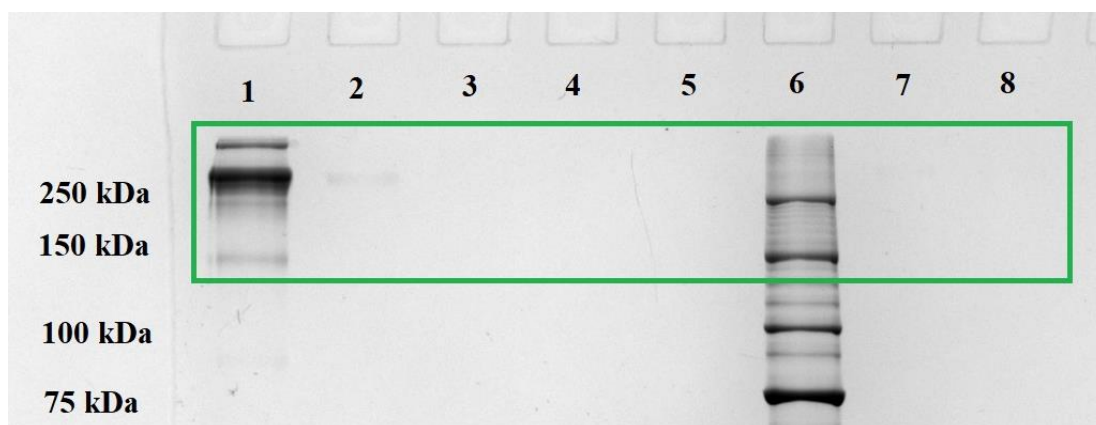
Třetím typem nosiče byly magnetické částice s kovalentně navázaným proteinem A. Jedná se protein, který byl nalezen v buněčných stěnách *Staphylococcus aureus*. Protein A je schopen interagovat s IgG většiny savců, někdy i s IgM a IgA. Přehled vazeb je v Tabulce č.4. Protein A se váže na Fc region IgG [191] a výsledkem je orientovaná vazba. V případě, že je protein A navázán na magnetickém nosiči, tak jeho vazba k IgG vytvoří imunosorbent s orientovanou imobilizovanou protilátkou. Protilátky jsou všechny stejně kovalentně navázány a nedochází ke sterickým zábránám. Orientovaná imobilizace protilátek zvyšuje vazebnou kapacitu imunosorbentu. To umožňuje lepší detekci navázaných antigenů [192].

Tabulka 4: Popis vazeb protilátek na protein A, převzato a upraveno [193]

Protilátky	Podtřída	Síla vazby
Lidské	IgG <sub>1</sub>	Silná vazba
	IgG <sub>2</sub>	Silná vazba
	IgG <sub>3</sub>	Neváže se
	IgG <sub>4</sub>	Silná vazba
	IgA	Neváže se
	IgM	Neváže se
Myší	IgG <sub>1</sub>	Slabá vazba
	IgG <sub>2a</sub>	Silná vazba
	IgG <sub>2b</sub>	Silná vazba
	IgG <sub>3</sub>	Silná vazba
	IgM	Neváže se
Kryší	IgG <sub>1</sub>	Slabá vazba
	IgG <sub>2a</sub>	Neváže se
	IgG <sub>2b</sub>	Neváže se
	IgG <sub>2c</sub>	Silná vazba
	IgM	Neváže se
Králičí	IgG	Silná vazba
	IgM	Neváže se
Ovčí	IgG <sub>1</sub>	Neváže se
	IgG <sub>2</sub>	Silná vazba
	IgM	Neváže se
Kozí	IgG <sub>1</sub>	Slabá vazba
	IgG <sub>2</sub>	Slabá vazba
	IgM	Neváže se
Hovězí	IgG <sub>1</sub>	Neváže se

	IgG <sub>2</sub>	Silná vazba
--	------------------	-------------

Pro vazbu nespecifických hIgG byly použity magnetické částice PureProteom™ Protein A Magnetic Beads. Kapacita magnetických částic byla 1,5 - 2,5 µg protilátky/µl magnetických částic. Pro samotnou vazbu se použilo 100 µl magnetických částic. K vazbě bylo použito 50 µg nespecifických hIgG (0,5 µg na jamku). Vazba protilátek probíhala podle pracovního postupu z kapitoly č. 3.8. Pro získání větší stability vazby byl použit S-NHS jako síťovadlo. Kontrola vazby se prováděla na SDS-PAGE. Výsledný gel byl barven roztokem amoniakálního stříbra. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Záznam gelu po SDS-PAGE je ukázán na Obrázku 22. Frakce byly na gel nanášeny bez předchozího zakoncentrování. Na gelu je v dráze č. 1 vidět výrazný pruh odpovídající původnímu vzorku nespecifických hIgG. V dráze č. 2 je nevýrazný proužek odpovídající množství hIgG ve vazebné frakci. Ve zbylých drahách, odpovídající promývacím frakcím, není vidět žádný proužek hIgG. Protilátky se na magnetické částice navázaly s 98% úspěšností.



Obrázek 22: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby nespecifických hIgG protilátek na magnetické částice (PureProteom™ Protein A Magnetic Beads)

1 – nespecifické hIgG (0,5 µg na jamku), 2 – vazebná frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 3 – 1. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 4 – 2. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 5 – 3. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 6 – standard molekulových hmotností, 7 – 1. promývací frakce po přidavku S-NHS (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 8 – 2. promývací frakce po přidavku S-NHS (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl); polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

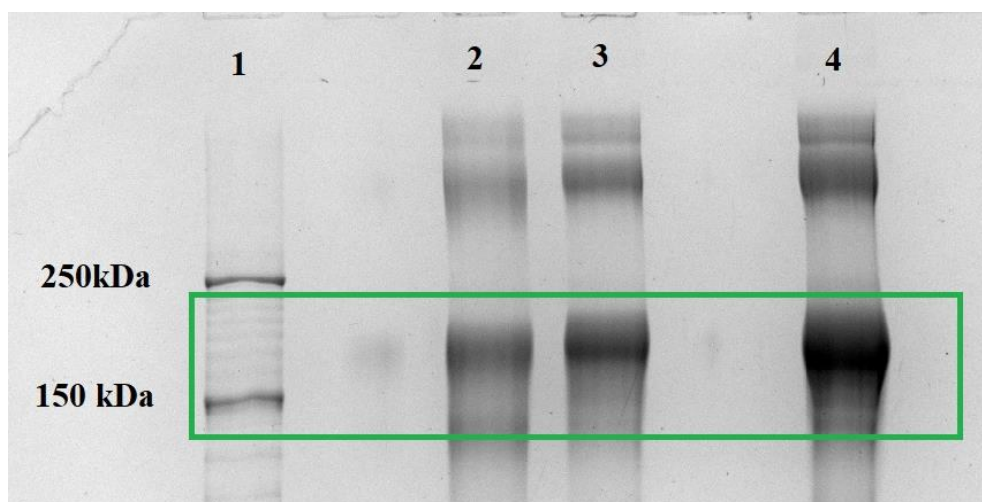
Účinnost tohoto nosiče byla, při vazbě nespecifický hIgG, nižší než u ostatních nosičů. To mohlo být způsobeno poškozenými Fc konci, které se pak nemohly kovalentně navázat k proteinu A. Také mohlo dojít k narušení proteinu A na povrchu magnetických částic.

#### 4.1.4 Vazba nespecifických IgG na magnetické částice modifikované streptavidinem

Čtvrtým typem nosiče byly magnetické částice s kovalentně vázaným streptavidinem. Pro vazbu byly konkrétně použity magnetické částice DYNABEADS™ MyOne™ Streptavidin C1 a biotinylované nespecifické hIgG, Protilátky byly biotinylovány Hydrazid-biotinem. Hydrazid-biotin se váže přes hydrazidovou skupinu na karbonylové skupiny karbohydrátových zbytků. Pro vznik této vazby byly hIgG oxidovány NaIO<sub>4</sub> díky čemu, na Fc koncích IgG, vznikly volné karbonylové skupiny. Vazba streptavidin-biotin je možná díky velké afinitě těchto dvou látek [190]. Streptavidin je protein pocházející z bakterie *Streptomyces avidinii* [194]. Jako v případě magnetických částic s kovalentně vázaným proteinem A, se i zde jedná o orientovanou vazbu protilátek.

Pro vazbu byl použit 1 mg magnetických částic a 20 µg biotinylovaných hIgG. Kontrola vazby probíhala na SDS-PAGE a výsledný gel byl barven roztokem amoniakálního stříbra.

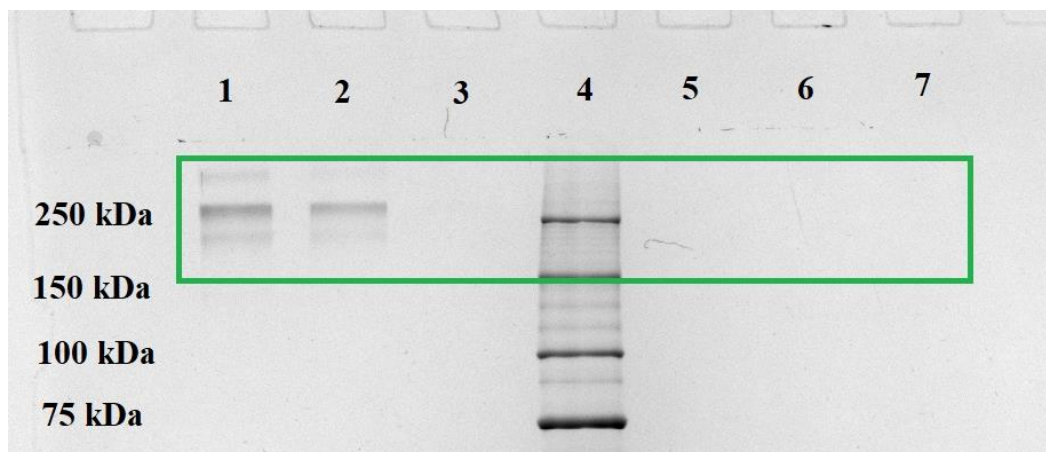
Pro biotinylací se použilo 200 µg nespecifických hIgG. Toto množství bylo použito pro předpokládanou 50% ztrátu během oxidace hIgG a jejich následného odsolování. Oxidace a biotinylace nespecifických hIgG probíhala podle pracovního postupu z kapitoly 3.9. Pro kontrolu biotinylace byla provedena SDS-PAGE na 7% polyakrylamidovém gelu, který byl barven roztokem amoniakálního stříbra. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Záznam gelu po SDS-PAGE je zobrazen na Obrázku 23. V drahách 2 a 3 jsou na Obrázku porovnávány stejné koncentrace hIgG. Je zde patrná jemná změna v molekulových hmotnostech, za předpokladu že na hIgG jsou navázány 2 molekuly hydrazid-biotin. Rozdíl hmotnosti mezi biotinylovanými a nebiotinylovanými protilátkami je 258,34 Da. Na gelu není vidět výrazná změna posunu v molekulových hmotnostech.



Obrázek 23: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti biotinylace nespecifických hIgG.

*1 – standard molekulových hmotností, 2 – biotinylované nespecifické hIgG (4  $\mu$ g na jamku), 3 – nebiotinylované hIgG (4  $\mu$ g na jamku), 4 – nebiotinylované hIgG (10  $\mu$ g na jamku); polyakrylamidový 7% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra*

Záznamový gel po SDS-PAGE s ukázkou vazby biotinylovaných protilátek je zobrazen na Obrázku 24. Byl použit 10% polyakrylamidový gel, který byl obarven roztokem amoniakálního stříbra. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Vazba probíhala podle pracovního postupu z kapitoly 3.10. Frakce byly na gel nanášeny bez předchozího zakoncentrování. Na gelu je v drahách č. 1 a 2 vidět původní vzorek biotinylovaných hIgG a jejich vazebná frakce. V drahách č. 3, 5, 6 a 7 není žádný proužek odpovídající vymytému hIgG. Biotinylované hIgG se z magnetického nosiče nevymývají. Biotinylované hIgG se na streptavidinové magnetické částice navázaly s 61% účinností.



Obrázek 24: Záznam SDS-PAGE – ověření vazby biotinylovaných hIgG na magnetické částice (DYNABEADS™ MyOne™ Spreptavidin C1.)

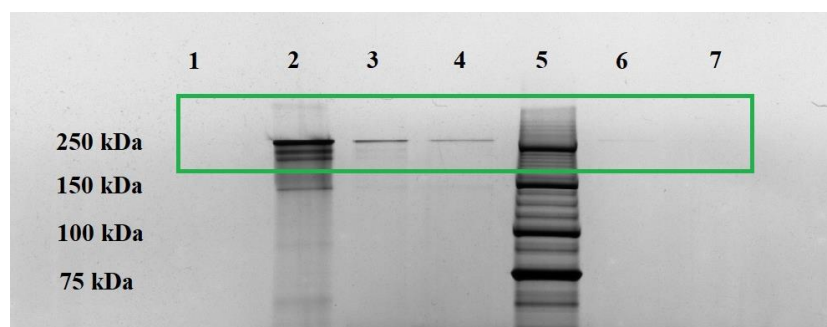
1 – biotinylované protilátky (na jamku), 2 – vazebná frakce (PBS pufr pH 7,4), 3 – 1. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), 4 – standard molekulových hmotností, 5 – 2. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), 6 – 3. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), 7 – 4. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4); polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

Účinnost vazby těchto magnetických částic, byla menší než u předchozích tří. Samotná vazba protilátek na nosič není obtížná, pro správnou vazbu je klíčové provést správnou biotinylací protilátek. Důvody špatné biotinylace mohou být různé, je jím nevhodný molární poměr mezi reaktivními skupinami biotinylované látky a vlastního reaktivního bitotinu, nadměrná biotinylace vedoucí ke stérickým zábránám vazby, ztráta vazebné aktivity protilátek po biotinylací.

## 4.2 PŘÍPRAVA IMUNOSORBENTŮ S RŮZNÝMI TYPY VAZBY SE SPECIFICKÝMI ANTI-HEA PROTILÁTKAMI

### 4.2.1 Vazba specifických anti-HE4 protilátek na magnetické částice s COOH funkční skupinou

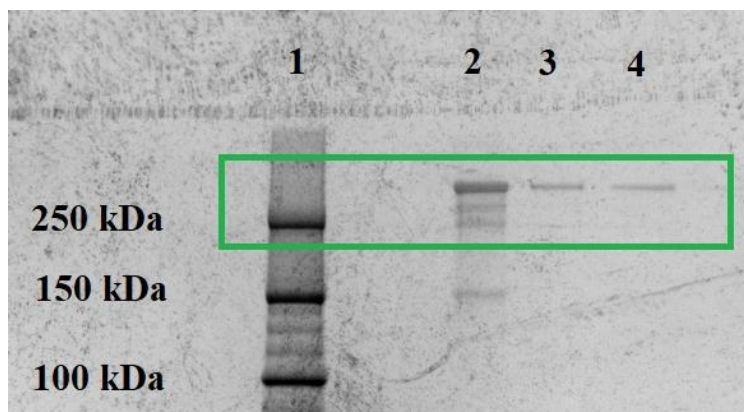
Vazba specifických anti-HE4 protilátek (HYTEST) probíhala na 1 mg magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou (SiMAG Carboxyl; DYNABEADS). Tyto nosiče byly zvoleny, protože na magnetických částicích s COOH funkční skupinou, byla vazba nespécifických hIgG 100%. Kromě částic DYNABEADS CARBOXILIC ACID, byly použity i jiné magnetické částice, konkrétně SiMAG Carboxyl. Jde o jiný druh částic, ale mají stejnou funkční skupinu. Na oba nosiče se vázalo 50 µg anti-HE4 protilátek. Kontrola vazby se prováděla na SDS-PAGE a výsledné gely se barvily roztokem amoniakálního stříbra. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc™XRS+System se softwarem ImageLab™. Záznam gelů pro SDS-PAGE jsou ukázány na Obrázku 25 a 26. Na Obrázku 25 je v dráze č. 2 vidět původní vzorek anti-HE4. V drahách č. 3 a 4 jsou vidět proužky anti-HE4. Tyto proužky odpovídají vazebné a vymývací frakci. Frakce byly na gel nanášeny bez předchozího zakoncentrování. Vazba anti-HE4 na magnetické částice DYNABEADS CARBOXILIC ACID proběhla z 57 %. Na Obrázku 26 je v dráze č. 2 vidět proužek v oblasti původního vzorku anti-HE4. V drahách 3 a 4 jsou proužky anti-HE4 odpovídající vazebné a promývací frakci. Frakce byly na gel nanášeny bez předchozího zakoncentrování. Vazba anti-HE4 na magnetické částice SiMAG Carboxyl proběhla ze 76 %.



Obrázek 25: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby anti-HE4 na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (DYNABEAD)

1 – 4. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), 2 – anti-HE4 (0,5 µg na jamku, HYTEST), 3- vazebná frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 4 – 1. promývací frakce (PBS pufr pH 7,4), 5 – standard molekulových hmotností, 6 – 2. promývací frakce PBS pufr pH 7,4, 7 – 3. promývací frakce PBS pufr pH 7,4; polyakrylamidový 10% gel; barveno amoniakálním roztokem stříbra.





Obrázek 26: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby anti-HE4 na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (SiMAG )

1 – standard molekulových hmotností, 2 – anti-HE4 (0,5 µg na jamku, HYTEST), 3 – vazebná frakce (0,1 M MES pufr pH 5,0), 4 – promývací frakce (PBS pufr pH 7,4); polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

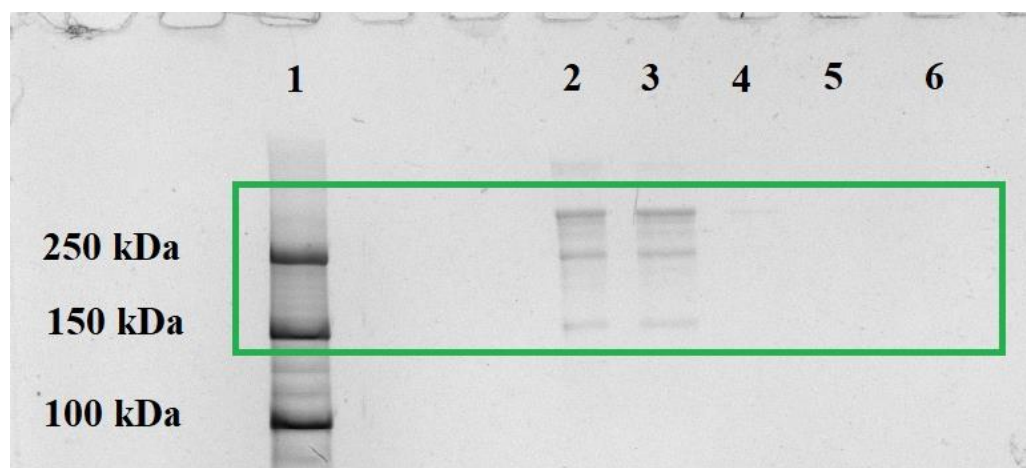
Po vyhodnocení vazby specifických protilátek, na dva různé magnetické nosiče se stejnou funkční skupinou, byla lepší vazba na magnetické částice SiMAG Carboxyl. Při dřívějších pokusech vazby nespecifických hIgG na tento nosič, však nebyla výsledná účinnost nijak velká. Magnetické částice DYNABEADS vážou nespecifický hIgG mnohem lépe.

Při vazbě specifických protilátek anti-HE4, měly magnetické částice SiMAG Carboxyl tendenci sorbovat na stěnu zkumavky. Aby se tomu předcházelo byly použity LoBind zkumavky. Na nich již k takovému efektu nedocházelo. I když měly DYNABEADS nižší vaznost specifických anti-HE4 protilátek, manipulace s nimi byla snadnější. Z toho důvodu byly vybrány jako jedna z možných variant nosiče pro konečnou vazbu anti-PTX3 protilátek.

#### 4.2.2 Vazba specifických anti-HE4 protilátek magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou

Po úspěšné vazbě nespecifických hIgG protilátek na magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou, bylo rozhodnuto o další vazbě. Nově se vážaly specifické anti-HE4 protilátky. Specifické protilátky se vážaly na magnetický nosič s hydrazidovou funkční skupinou (SiMAG). Jedná se o dostupnější komerční nosič, než je magnetický nosič s hydrazidovou funkční skupinou (co-EDMA-NHNH<sub>2</sub>.) Vazba specifických anti-HE4 protilátek probíhala na 1 mg magnetických částic SiMAG Hydrazide. K vazbě bylo použito 50 µg anti-HE4 protilátek (0,5 µg na jamku, HYTEST). Kontrola vazby se prováděla na SDS-PAGE. Výsledné gely byly barveny roztokem amoniakálního stříbra. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS+System se softwarem ImageLab<sup>TM</sup>.

Záznam gelu po SDS-PAGE je ukázán na Obrázku 27. Frakce byly na gel nanášeny bez předchozího zakoncentrování. Na gelu, v drahách 2 a 3 jsou vidět proužky odpovídající původnímu vzorku a vazebné frakci. V promývacích frakcích (dráha č. 4-6) již nejsou proužky zřejmé. Protilátky se na magnetické částice navázaly s 23% účinností.



Obrázek 27: Záznam SDS-PAGE – ověření účinnosti vazby specifických anti-HE4 protilátek na magnetické částice SiMAG Hydrazide

1 – standard molekulových hmotností, 2 – specifické anti-HE4 protilátky (0,5 µg na jamku, HYTEST), 3 – vazebná frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0), 4 – 1. promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0), 5 – 2. promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0), 6 – 3. promývací frakce (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0); polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

Vazba hIgG pomocí hydrazidové funkční skupiny byla účinná ze 100 %, zatímco v případě vazby specifických anti-HE4 protilátek byla účinnost pouze z 23 %.

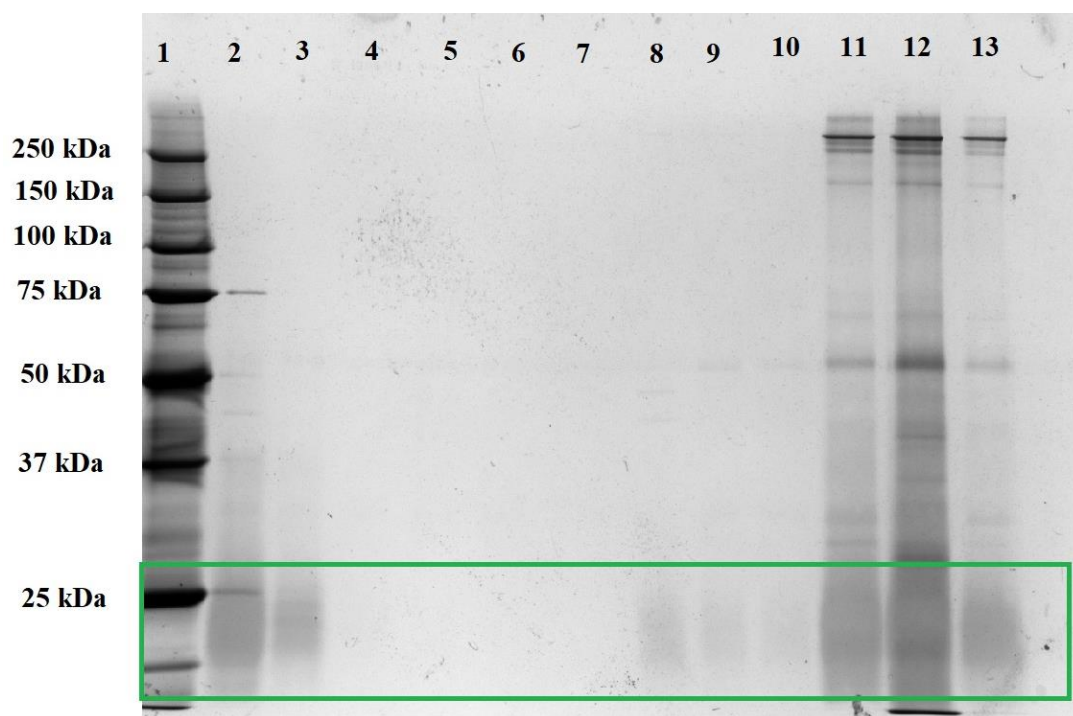
Takto snížená účinnost vazby u anti-HE4 protilátek mohla mít více důvodů. Pravděpodobně tyto specifické protilátky neobsahovaly plně funkční glykosylaci v Fc části. Díky tomu nemohlo dojít k vytvoření karbonylových skupin, které jsou nutné pro navázání hydrazidu. Dalším důvodem mohly být podmínky oxidace protilátek  $\text{NaIO}_4$ , který mohl místo karbonylových skupin vytvořit nereaktivní karboxylové skupiny a snížit tak účinnost vazby. Nižší účinnost vazby mohla být způsobena i vyšší citlivostí specifických IgG vůči oxidaci  $\text{NaIO}_4$ . Molekuly se tak mohly poškodit ještě před samotnou vazbou na nosič. U této metody také mohlo docházet ke ztrátám protilátek během odsolování na AMICON filtrech, jenž pracují na principu molekulových sít.



## **4.3 VAZBA ANTIGENU HE4 NA IMUNOSORBENTY SE SPECIFICKÝMI ANTI-HE4 PROTILÁTKAMI**

### **4.3.1 Vazba antigenu HE4 na imunosorbent s magnetickými částicemi s COOH funkční skupinou**

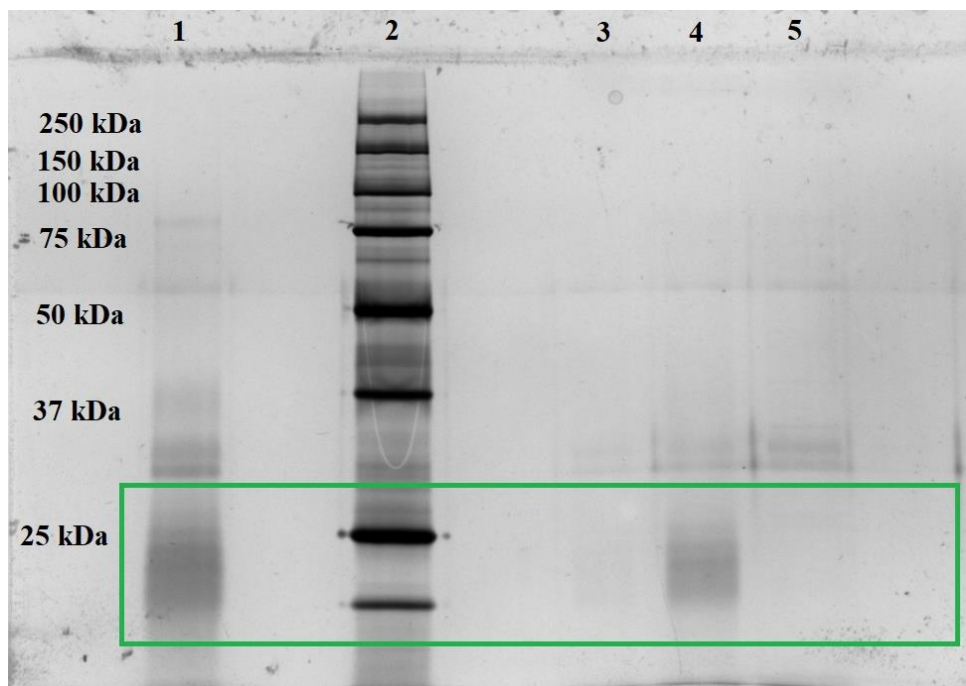
Pro vazbu antigenu HE4 byly použity imunosorbenty s navázanými anti-HE4 specifickými protilátkami. Prvním použitým imunosorbentem byly magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou (SiMAG) s navázanými anti-HE4 protilátkami. Na imunosorbent se aplikovalo 10 µg HE4 antigenu. Vazba antigenu se kontrolovala na SDS-PAGE. Po navázání antigenu na imunosorbent, se antigen eluoval. Imunosorbent se rozdělil na 2x 500 µg nosiče, první polovina prošla kyselou elucí a druhá zásaditou. Kontrola elucí se dělala na SDS-PAGE. Záznam gelu po SDS-PAGE je ukázán na Obrázku 28. Antigen HE4 má molekulovou hmotnost 26kDa. Pro jeho lepší zobrazení je použit 12% polyakrylamidový gel. Na gelu je v drahách č. 2, 3, 8, 9, 10 vidět původní vzorek antigenu HE4, jeho vazebná frakce a eluce. Kyselá eluce uvolňovala pouze požadovaný antigen HE4. Zásadité prostředí 0,1M roztoku vodného roztoku amoniaku způsobilo narušení amidové vazby mezi protilátkou a funkční skupinou na povrchu magnetické částice, až došlo k její ztrátě. Uvolněné protilátky jsou patrné v horní části drah č. 11, 12, 13. Vazba a eluce probíhala podle pracovního postupu z kapitoly 3.7. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS+System se softwarem ImageLab<sup>TM</sup>. Při vyhodnocování se započítal i faktor zakoncentrování jednotlivých elucí a promývacích frakcí. Faktor zakoncentrování byl 13,3. Na nosič se antigen HE4 navázal s 18% účinností. Kyselá eluce uvolnila z navázaného množství 19% antigenu. Vazba i eluce měla nízkou účinnost.



Obrázek 28: Záznam SDS-PAGE – kontrola účinnosti vazby a eluce HE4 antigenu na imunosorbent s anti-HE4 protilátkami na magnetických částicích (SiMAG)

1 – standard molekulových hmotností, 2 – HE4 antigen (0,2 µg na jamku), 3 – vazebná frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0), 4 – 1. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 0,2M NaCl), 5 – 2. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 0,2M NaCl), 6 – 3. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 0,2M NaCl), 7 – 4. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 1M NaCl), 8 – 1. kyselá eluce (0,05% TFA), 9 – 2. kyselá eluce (0,05% TFA), 10 – 3. kyselá eluce (0,05% TFA), 11 – 1. zásaditá eluce (0,1M vodný roztok amoniaku), 12 – 2. zásaditá eluce (0,1M vodný roztok amoniaku), 13 – 3. zásaditá eluce (0,1M vodný roztok amoniaku); polyakrydový 12% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

Druhým imunosorbentem použitým pro vazbu antigenu HE4, byl nosič z magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou (DYNABEADS) s navázanými anti-HE4 protilátkami. Pracovní postup vazby a eluce antigenu HE4 je popsán kapitole 3.7. V tomto případě se z důvodu uvolnění navázaných protilátek z povrchu magnetických částic neprováděla zásaditá eluce 0,1M vodným roztokem amoniaku, proto se nosič nerozděloval na dvě části. Eluce probíhala na celém 1 mg imunosorbentu. Zmenšil se i počet promývacích frakcí, kdy se nosič po navázání antigenu promýval 3x1 ml 0,1M fosfátovým pufrem pH 7,0 s 0,1M NaCl a 2x1 ml 10mM fosfátového pufru pH 7,0. Na nosič bylo aplikováno 10 µg HE4 antigenu. Záznam gelu po SDS-PAGE je ukázán na Obrázku 29. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc™ XRS+System se softwarem ImageLab™. Nejvýraznější je v dráze č. 1 původní vzorek HE4 a v dráze č. 4, 2. kyselá eluce HE4 antigenu. Eluční frakce byly zakoncentrovány. Ve vyhodnocování účinnosti eluce bylo počítáno s faktorem zakoncentrování. Koncentrační faktor byl 13,3. Z imunosorbentu byl antigen eluován s 4,26% účinností.

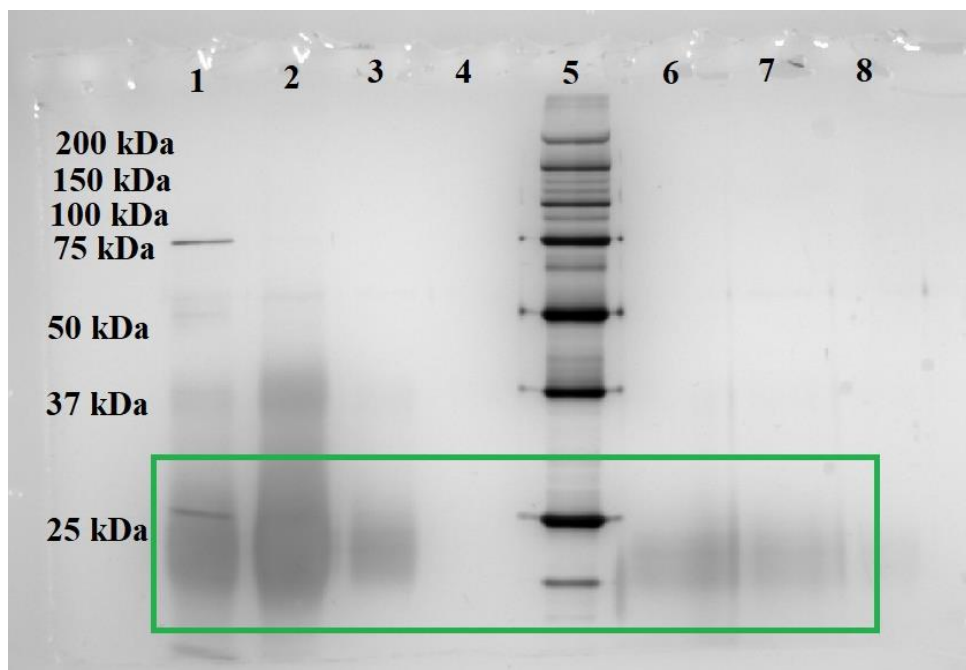


Obrázek 29: Záznam SDS-PAGE – kontrola účinnosti vazby a eluce HE4 antigenu na imunosorbent s anti-HE4 protilátkami na magnetických částicích (DYNABEADS)

1 – vzorek HE4 antigenu (0,2 µg na jamku), 2 – standard molekulového markeru, 3 – 1. kyselá eluce (0,05% TFA), 4 – 2. kyselá eluce (0,05% TFA), 5 – 3. kyselá eluce (0,05% TFA); polyakrylamidový 12% gel; barveno amoniakálním roztokem stříbra.

#### 4.3.2 Opakovaná vazba antigenu HE4 na imunosorbent s magnetickými částicemi s COOH funkční skupinou

Nosič, z magnetických částic s karboxylovou funkční skupinou (DYNABEADS), zde byl znovu použitý pro vazbu antigenu HE4. Důvodem bylo zjištění opakovatelnosti použití imunosorbentu po jeho regeneraci. Na nosič se znovu vázalo 10 µg antigenu HE4. Záznam gelu po SDS-PAGE je ukázán na Obrázku 30. Vazba proběhla za stejných podmínek jako poprvé. Zakoncentrování vazebné, promývací a eluční frakce bylo započítáno do vyhodnocování účinnosti vazby. Koncentrační faktor pro vazebnou a promývací frakci byl 12,5, pro eluční frakce byl 2,5. Vyhodnocení bylo provedeno na denzitometrické stanici G:BOX a softwaru GeneTools from SynGene. Kontrola probíhala na 10% polyakrylamidovém gelu a výsledný gel byl barven roztokem amoniakálního stříbra. Antigen se navázal z 98 % na magnetické částice. Následně se při eluci z nosiče uvolnily 3 % antigenu HE4. Opakované použití nosiče bude vyžadovat buď změnu nosiče, nebo optimalizaci podmínek vazby a eluce.

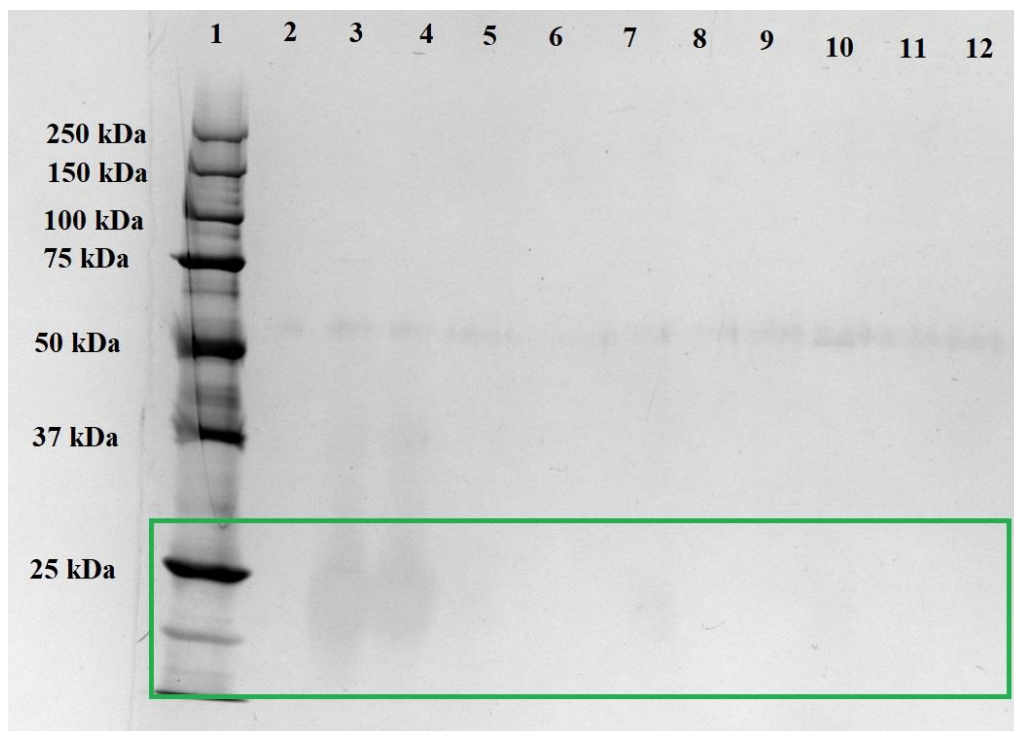


Obrázek 30: Záznam SDS-PAGE – Kontrola účinnosti druhé vazby a eluce HE4 antigenu na imunosorbent s anti-HE4 protilátkami na magnetických částicích (DYNABEADS)

1 – HE4 antigen (0,2  $\mu\text{g}$  na jamku), 2 – vazebná frakce, 3 – 1. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 0,1M NaCl), 4 – 2. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0 s 0,1M NaCl), 5 – standard molekulových hmotností, 6 – 1. eluce (0,05% TFA), 7 – 2. eluce (0,05% TFA), 8 – 3. eluce (0,05% TFA); polyakrylamidový 12% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

### 4.3.3 Vazba antigenu HE4 na imunosorbent s magnetickými částicemi s hydrazidovou funkční skupinou

Byl použit imunosorbent s anti-HE4 protilátkami navázanými na magnetických částicích s hydrazidovou funkční skupinou (SiMAG). Na imunosorbent bylo aplikováno 10  $\mu\text{g}$  antigenu (0,2  $\mu\text{g}$  na jamku). Vazba antigenu probíhala podle pracovního postupu v kapitole 3.7. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS+System se softwarem ImageLab<sup>TM</sup>. Záznam gelu po SDS-PAGE je ukázán na Obrázku 31. Na gelu je v drahách č. 3 a 4 vidět původní vzorek HE4 antigenu a jeho vazebná frakce. Vazebná, promývací a eluční frakce byly zakoncentrovány. Koncentrační faktor pro vazebnou a promývací frakci byl 13,5. Pro eluční frakci byl koncentrační faktor 2,5. Koncentrační faktory byly započítány při vyhodnocení účinnosti vazby. V drahách č. 7–12 pro eluční frakce nejsou vidět žádné proužky odpovídající eluovanému antigenu HE4. Na imunosorbent se navázal antigen HE4 s 28% účinností.



Obrázek 31: Kontrola vazby a eluce HE4 antigenu na imunosorbent s anti-HE4 na SiMAG Hydrazide

*1 – standard molekulového markeru, 2 – prázdná pozice, 3 – HE4 antigen (0,2 µg na jamku), 4 – vazebná frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0), 5 – 1. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr s 0,2M NaCl), 6 – 4. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr s 1M NaCl), 7 – 1. kyselá eluce (0,05% TFA), 8 – 2. kyselá eluce (0,05% TFA), 9 – 3. kyselá eluce (0,05% TFA), 10 – 1. zásaditá eluce (0,1M vodný roztok amoniaku), 11 – 2. zásaditá eluce (0,1M vodný roztok amoniaku), 12 – 3. zásaditá eluce (0,1M vodný roztok amoniaku); polyakrylamidový 12% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.*

Vazba antigenu na magnetické nosiče probíhala ve všech případech stejně. U všech imunosorbentů byla účinnost vazby i eluce pod 30 %. Účinný imunosorbent by měl být schopen vychytat antigen ze vzorku s minimální účinností 60 %.

V dalším kroku se přistupovalo k výběru samotného magnetického nosiče. Po zhodnocení účinnosti všech nosičů a vazeb s nespecifickými a nespecifickými protilátkami. Jako nejlepší magnetický nosič se jevíly magnetické částice s kovalentně navázaným proteinem A.

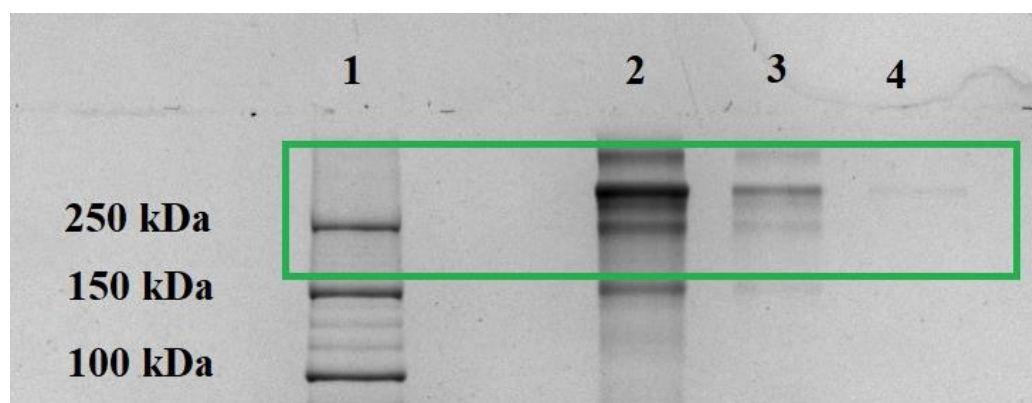
### 4.3 PŘÍPRAVA IMUNOSORBENTU S ANTI-PTX3 PROTILÁTKAMI

Magnetické částice a karboxylovou skupinou mají vysokou účinnost vazby pro nespecifické hIgG, ale nezaručují orientovanou vazbu protilátek. Magnetické částice s hydrazidovou funkční skupinou vázaly nespecifické hIgG protilátky silně, ale měly slabou účinnost vazby se specifickými anti-HE4 protilátkami. Vázání protilátek na magnetické částice s povrchem modifikovaným streptavidinem mělo u nespecifických hIgG více jak 50% účinnost, ale v porovnání s proteinem A, byla účinnost malá.

Po těchto zjištěních byl pro imunosorbent, tvořený z anti-PTX3 protilátek, zvolen nosič magnetických částic s proteinem A, navázaným na jejich povrch. Protilátky se na protein A váží orientovanou vazbou, což zajišťuje dostatek volných míst pro vazbu antigenu. Pro vznik vazby mezi proteinem A a IgG není nutná žádná předchozí úprava IgG.

#### 4.3.1 Uvolnění nespecifických IgG z magnetických částic s modifikovaným proteinem A a stabilizovaných pomocí S-NHS

Magnetické částice s proteinem A zajišťují orientovanou vazbu a pro vazbu protein A – IgG nevyžadují žádnou speciální úpravu protilátek. Na Obrázku 32 je zobrazen záznam gelu po SDS-PAGE, kde je vidět eluce hIgG z imunosorbentu kyselým prostředím glycinového pufru pH 2,8. Kyselé prostředí narušuje kovalentní vazbu mezi hIgG a proteinem A. v drahách č. 2-4 je vidět postupná eluce hIgG. Zároveň to slouží jako důkaz vazby mezi hIgG a proteinem A.



Obrázek 32: Záznam SDS-PAGE – Eluce hIgG z imunosorbentu s proteinem A

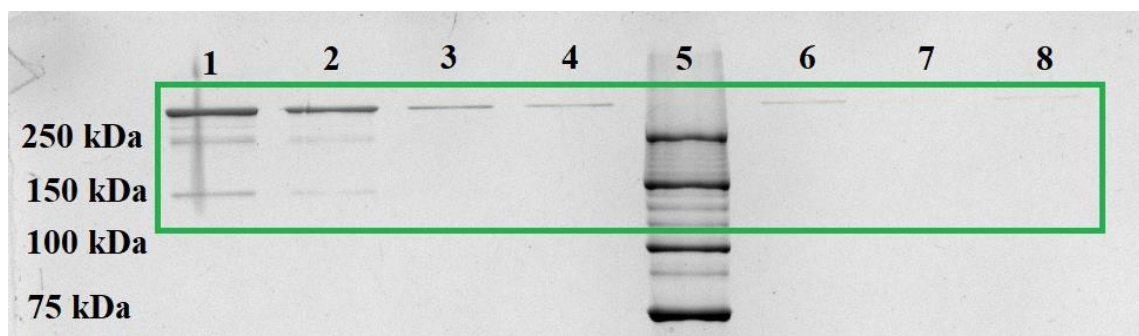
1 – standard molekulových hmotností, 2 – 1. eluční frakce (glycinový pufr pH 2,8), 3 – 2. eluční frakce (glycinový pufr pH 2,8), 4 – 1. promývací frakce (fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl); polyarylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.



Pro lepší stabilizaci protilátek na protein A bylo použito síťovadlo, konkrétně S-NHS. Zde je vidět, že ani pomocná stabilizace vazby mezi proteinem A a hIgG, nebyla dostatečná pro zabránění narušení jejich vazby.

#### 4.3.2 Vazba specifických anti-PTX3 protilátek na magnetické částice modifikované proteinem a stabilizované S-NHS

Pro tvorbu imunosorbentu s anti-PTX3 protilátkami byl použit nosič magnetických částic PureProteom™ Protein A™ Magnetic Beads a myší monoklonální protilátky PTX3 monoclonal antibody (M01; clone 5B7), nebo polyklonální králičí protilátky Polyclonal Rabbit anti-human PTX3 (LS-C804485). Pro obě vazby bylo použito 100 µl magnetického nosiče a 20 µg IgG od každého typu vzorku protilátek. Vazba probíhala podle pracovního postupu v kapitole 3.8. Kontrola obou vazeb proběhla na polyakrylamidových 10% gelech, které byly obarveny roztokem amoniakálního stříbra. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem ImageLab™. Záznam gelu po SDS-PAGE, s monoklonálními myšími anti-PTX3 protilátkami, je ukázán na Obrázku 33. Záznam gelu po SDS-PAGE, s polyklonálními králičími anti-PTX3 protilátkami, je ukázán na Obrázku 34. Jak je výše uvedeno v tabulce č.3, myší monoklonální protilátky mají slabou vazbu na protein A. Proto se byly schopny navázat pouze z 33 %. Proužky odpovídající nenavázaným protilátkám jsou viditelné v drahách promývacích frakcí s fosfátovým pufrům pH 7,2 s 0,15M NaCl, ale i v dráze č. 8, která odpovídá 2. promývací frakci po přidání 2,5 µM S-NHS.

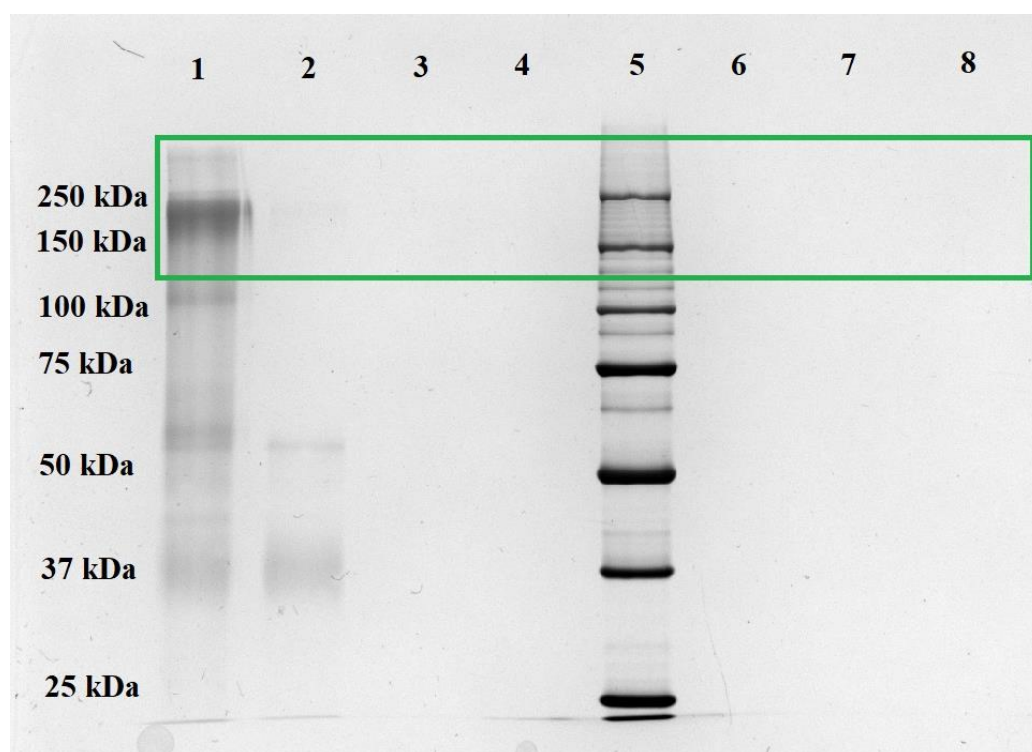


Obrázek 33: Záznam SDS-PAGE –kontrola účinnosti vazby monoklonálních PTX3 protilátek (M01; clone 5B7) na PureProteom™ Protein A™ Magnetic Beads

1 – myší monoklonální anti-PTX3 protilátka (0,8 µg na jamku), 2 – vazebná frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 3 – 1. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 4 – 2. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 5 – standardní molekulový marker, 6 – 3. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 7 – 1. promývací frakce (po přidání 2,5 µM S-NHS; 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 8 – 2. promývací frakce (po přidání 2,5 µM S-NHS; 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl)

přidání 2,5  $\mu\text{M}$  S-NHS; 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl); polyakrylamidový 10% gel; barveno amoniakálním roztokem stříbra.

Polyklonální králičí protilátky se naopak k proteinu A vážou silnou vazbou. Na nosič se tak navázalo 76% anti-PTX3 protilátek. Na gelu s polyklonálními protilátkami je v drahách č. 1 a 2 viditelné proužky okolo oblasti 50 a 37 kDa. Proužky v těchto oblastech naznačují fragmenty protilátek. Ty mohou být způsobeny manipulací se vzorkem, nebo nebyly protilátky při výrobě dostatečně purifikovány.



Obrázek 34: Záznam SDS-PAGE – kontrola vazby polyklonálních králičích protilátek anti-PTX3 (LS-C804485) na PureProteom™ Protein A™ Magnetic Beads

1 - Polyclonal Rabbit anti-human PTX3 (0,8  $\mu\text{g}$  na jamku), 2 – vazebná frakce, 3 – 1. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 4 – 2. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 5 – standard molekulových hmotností, 6 – 3. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 7 – 1. promývací frakce (po přidavku 2,5  $\mu\text{M}$  S-NHS; 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl), 8 – 2. promývací frakce (po přidavku 2,5  $\mu\text{M}$  S-NHS; 0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,15M NaCl); polyakrylamidový 10% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

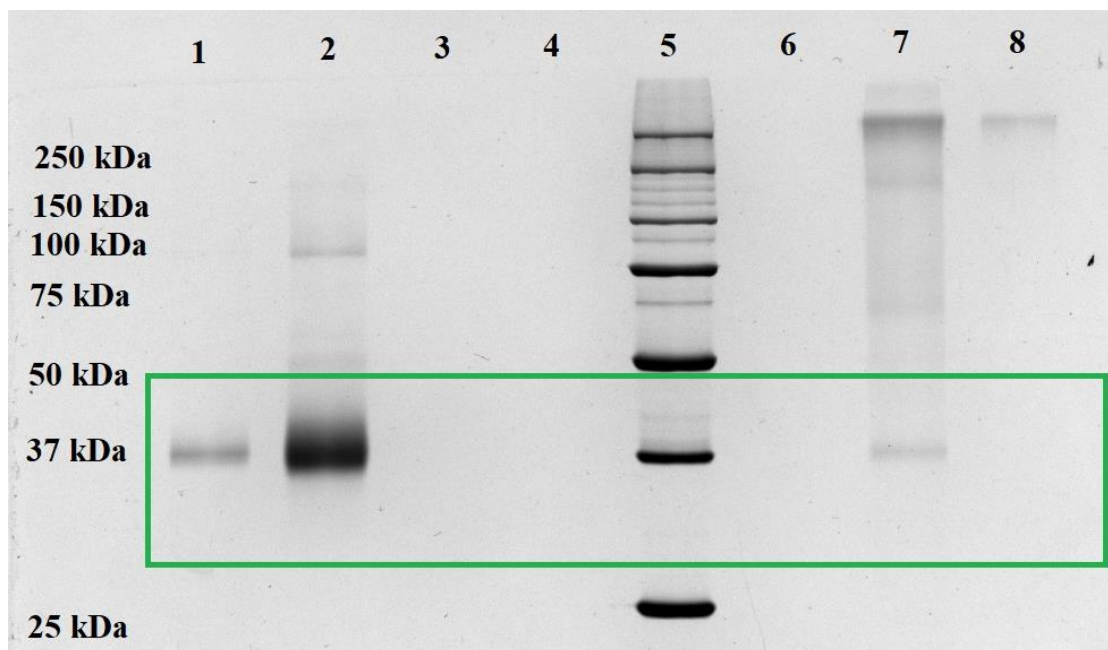
Protein A lépe váže protilátky králičího původu než protilátky myši. Všechny protilátky tak jsou charakteristické pouze svou vazbou na jedno místo. Polyklonální protilátky jsou připravovány imunizací zvířat a obsahují tedy protilátky s afinitou k různým antigenním determinantám cílového antigenu. Vazba a účinnost vychytávání je proto vyšší a drobné změny v konformaci antigenu za *in vitro* podmínek je neovlivní. Monoklonální látky jsou produkovány hybridomem, což je spojení myelomové buňky a vybraného klonu B lymfocytů.



Tyto protilátky mají afinitu pouze k jedné antigenní determinantě. Pokud dojde ke změně této determinanty je vazba monoklonálních protilátek snížena.

#### 4.4 VAZBA PTX3 ANTIGENU NA IMUNOSORBENT A JEHO NÁSLEDNÁ ELUCE

Pro navázání PTX3 antigenu byl zvolen nosič s polyklonálními králičími protilátkami. Bylo spočítáno, že vezme-li se v úvahu 75% účinnost vazby protilátek na protein A, měl by imunosorbent vyvázat 8  $\mu\text{g}$  antigenu PTX3. Pro samotnou vazbu pak bylo zvoleno 15  $\mu\text{g}$  antigenu PTX3. Vazba probíhala podle pracovního postupu v kapitole 3.7. Jen se nepromývalo 1 ml promývacího pufru, ale jen 0,5 ml. Nosič se promyl 3 x 0,5 ml 0,1M fosfátovým pufrům pH 7,2 s 0,1M NaCl, pak se promyl 2 x 0,5 ml 10mM fosfátového pufru pH 7,2. Eluce probíhala v 100  $\mu\text{l}$  0,05% TFA pH 2,96. pH 0,05% TFA bylo upraveno 9M NaOH, aby se zabránilo uvolnění protilátek navázaných na povrch magnetických částic, během eluce antigenu. Vazba a eluce byla kontrolována na SDS-PAGE. Účinnost vazby pak byla vyhodnocena na stanici ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS+System se softwarem ImageLab<sup>TM</sup>. Kontrola probíhala na 12% polyakrylamidovém gelu, z důvodu lepšího záchytu antigenu PTX3, který má necelých 42 kDa. Záznam gelu po SDS-PAGE je ukázán na Obrázku 35. Vazebná a promývací frakce byly zkoncentrovány na AMICON filtrech z 500  $\mu\text{l}$  na 40  $\mu\text{l}$ . Eluční frakce byly zkoncentrovány ze 100  $\mu\text{l}$  na 40  $\mu\text{l}$ . koncentrační faktor byl započítán do vyhodnocení vazby a eluce. Po vyhodnocení vazby a eluce se na imunosorbent navázalo 18% antigenu PTX3, což odpovídá 2,75  $\mu\text{g}$  a 68 pmolům antigenu PTX3. V eluci se z navázaného množství antigenu eluovalo 80 %, což odpovídá 2,19  $\mu\text{g}$  a 54 pmolům antigenu PTX3. Na Obrázku 35 je vidět, že v drahách č. 2. a 3 jsou proužky odpovídající svou velikostí (oblast 250 kDa) anti-PTX3 polyklonálním protilátkám. pH 2,96 je stále dostatečně nízké pro rozrušení vazby mezi IgG a proteinem A.



Obrázek 35: Kontrola vazby a eluce antigenu PTX3 na imunosorbent

1 – PTX3 antigen (0,3 µg na jamku), 2 – zakoncentrovaná vazebná frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,0), 3 – 1. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,1M NaCl), 4 – 2. promývací frakce (0,1M fosfátový pufr pH 7,2 s 0,1M NaCl), 5 – standard molekulových hmotností, 6 – 1. eluční frakce (0,05% TFA pH 2,96), 7 – 2. eluční frakce (0,05% TFA pH 2,96), 8 – 3. eluční frakce (0,05% TFA pH 2,96); polyarylamidový 12% gel; barveno roztokem amoniakálního stříbra.

Vazbou králičích polyklonálních protilátek na magnetický nosič s modifikovaným proteinem A, byl připraven imunosorbent. Tento imunosorbent byl schopen v malé míře vazby rekombinantního proteinu PTX3. Pro větší účinnost vazby je nutné optimalizovat podmínky vazby. Eluce antigenu PTX3 byla naopak velmi účinná.

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit vhodný imunosorbent pro záchyt proteinu Pentraxinu 3 ze vzorků plodové vody. Pentraxin 3 je protein nacházející se během těhotenství v plodové vodě. Jeho hodnoty odpovídají závažnosti infekce. Byl vybrán jako jeden z biomarkerů pro určení předčasného odtoku plodové vody vlivem infekčního zánětu.

Imunosorbent byl připraven izolací specifických anti-PTX3 protilátek na povrch magnetických částic. Pro zvolení vhodného nosiče byly nejprve připraveny imunosorbenty s modelovými vzorky protilátek. Jednalo se o nespecifické hIgG a specifické anti-HE4 protilátky. Pro zjištění účinnosti připravených imunosorbentů, byla vyzkoušena i vazba s modelovým rekombinantním proteinem HE4.

Pro přípravu samotného imunosorbentu s anti-PTX3 protilátkami byl vybrán nosič s kovalentně navázaným proteinem A. Z předem otestovaných protilátek proti lidskému PTX3, byly pro vazbu nakonec vybrány králičí polyklonálních anti-human PTX3, tedy protilátky s prokázanou vazností pro rekombinantní PTX3, který byl v laboratoři k dispozici. Takto připravený imunosorbent byl schopen navázat rekombinantní lidský protein PTX3, avšak experimenty prokázaly, že imunosorbent nebyl vhodný pro opakované použití. Kyselé prostředí elučního činidla uvolňovalo i nekovalentně biospecificky navázané anti-PTX3 protilátky.

Pro získání lepších výsledků bude nutná optimalizace postupu vazby. Jedním z parametrů pro optimalizaci může být doba inkubace magnetických částic s protilátkami a dále nalezení vhodného síťovacího činidla, které by zajistilo kovalentní provázání mezi proteinem A na nosiči a zachycenou imunoglobulinovou molekulou.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MANDELBAUM, Bernard; EVANS, Tommy N. Life in the amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1969, 104.3: 365-377.
- [2] MOORE, Thomas R. Amniotic fluid dynamics reflect fetal and maternal health and disease. *Obstetrics & Gynecology*, 2010, 116.3: 759-765.
- [3] BRACE, Robert A., et al. Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1989, 161.2: 382-388.
- [4] DOLEŽALOVÁ, Hana. *Metody charakterizace chemického a fázového složení lidské plodové vody*. Ostrava, 2012. Diplomová práce. Vysoká škola Báňská – Technická Univerzita Ostrava.
- [5] MOORE, Thomas R. The role of amniotic fluid assessment in evaluating fetal well-being. *Clinics in perinatology*, 2011, 38.1: 33-46.
- [6] SOUČKOVÁ, Zuzana. *Daignostický potenciál plodové vody*. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
- [7] BONSNES, Roy W. Composition of amniotic fluid. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 1966, 9.2: 440-448.
- [8] EDDLEMAN, Keith A., et al. Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstetrics & Gynecology*, 2006, 108.5: 1067-1072.
- [9] ELIAS, Shermanet. al. Amniocentesis. In: *Genetic disorders and the fetus*. Springer, Boston, MA, 1986, 31-52.
- [10] MYAOCLINIC, staff. Amniocentesis. *MAYOCLINIC* [online]. 2020 [researchgate] [https://www.researchgate.net/figure/Predicted-molecular-structure-of-PTX3-A-Amino-acid-sequence-in-the-PTX3-N-terminus\\_fig3\\_307921920](https://www.researchgate.net/figure/Predicted-molecular-structure-of-PTX3-A-Amino-acid-sequence-in-the-PTX3-N-terminus_fig3_307921920)
- [11] MICHAEL, John-Edwards, et. al. Comprehensive Proteomic Analysis of the Human Amniotic Fluid Proteome: Gestational Age-Dependent Changes. *Journal of proteon research*. 2007,1277-1285.

- [12] FISCHBACHER, P. H., Qualitative and quantitative analysis of the proteins in human amniotic fluid. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1970, 108.7; 1051-1055
- [13] FAUZA, Dario. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 2004, 18.6: 877-891.
- [14] STEPAN, Martin, et al. Maternal serum C-reactive protein in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS One*, 2016, 11.3: e0150217
- [15] HÁJEK, Z., et. al. *Porodnictví*. Grada, 2014, 27-51, ISBN: 978-80-247-4529-9
- [16] Chan-Kyung J.Cho, et. al. Proteomics Analysis of Human Amniotic Fluid. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007, (6), 1406-1415.
- [17] BRZEZINSKI, Aharon, et. al. Protein composition of early amniotic fluid and fetal serum with a case of bis-albuminemia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1964, 89.4: 488-494.
- [18] SEPPÄLÄ, M., et. al. Alpha fetoprotein in amniotic fluid: an index of gestational age. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1972, 114.5: 595-598.
- [19] SALGÓ, László, et. al. Variation in some enzymes in amniotic fluid and maternal serum during pregnancy. *Enzyme*, 1989, 41: 101-107.
- [20] DAWOOD, M. Yusoff. Hormones in amniotic fluid. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1977, 128.5: 576-583.
- [21] DASHE, Jodi S., et al. Correlation between amniotic fluid glucose concentration and amniotic fluid volume in pregnancy complicated by diabetes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2000, 182.4: 901-904
- [22] CEDERQVIST, Lars L., et al. Detectability and pattern of immunoglobulins in normal amniotic fluid throughout gestation. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1978, 130.2: 220-224.
- [23] BENZIE, R. J., et al. Composition of the amniotic fluid and maternal serum in pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1974, 119.6: 798-810.
- [24] ROOPNARINESINGH, Syam, et.al. Amniotic fluid urea and creatinine in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 1971, 78.1: 29-33.

- [25] HARRISON, R. F. Amniotic fluid uric acid levels in the maturing fetus. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 1972, 79.8: 708-709.
- [26] TYSON, J. E., et al. Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1972, 113.1: 14-20.
- [27] HWANG, P., et. al radioimmunoassay for human prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1971, 68.8: 1902-1906.
- [28] BEALL, M. H., et al. Amniotic fluid water dynamics. *Placenta*, 2007, 28.8-9: 816-823.
- [29] BARKIN, Suzzane Z, et. al. Severe Polyhydramnios: Incidence of Anomalies. *American Journal of Roentgenology*. 1987, **148**(1), 155-159.
- [30] HAMZA, A., et al. Polyhydramnios: causes, diagnosis and therapy. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 2013, 73.12: 1241-1246.
- [31] JEFFCOATE, T. N. A.; SCOTT, J. S. Polyhydramnios and oligohydramnios. *Canadian Medical Association Journal*, 1959, 80.2: 77.
- [32] FAYYAZ, Humera, et. al. TORCH screening in polyhydramnios: an observational study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2011, **25**(7), 1069-1072.
- [33] KORNACKI, Jakub, et al. Polyhydramnios—frequency of congenital anomalies in relation to the value of the amniotic fluid index. *Ginekologia polska*, 2017, 88.8: 442-445.
- [34] GOLAN, Abraham, et. al. Oligohydramnios: Maternal Complications and Fetal Outcome in 145 Cases. *Gynecol Ostet Invest*. 1994, **37**, 91-95.
- [35] SHENKER, Lewis, et al. Significance of oligohydramnios complicating pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1991, 164.6: 1597-1600.
- [36] SPIRO, Judith Eva, et al. Renal oligo-and anhydramnios: cause, course and outcome—a single-center study. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2015, 292.2: 327-336.
- [37] KIRANMAIE, S. A study on maternal outcome of pregnancy with PROM in a tertiary hospital. *International journal of medical research & health sciences*, 2014, 34: 34.

- [38] SIMHAN, Hyagriv N., et. al. Preterm premature rupture of membranes: diagnosis, evaluation and management strategies. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2005, (112), 32-37.
- [39] PARRY, Samuel, et, al. Premature Rupture of the Fetal Membranes. *The New England Journal of Medicine*. 2014, **338**(10), 663-670.
- [40] HILLIER, PH. D., et. al. A Case–Control Study of Chorioamnionic Infection and Histologic Chorioamnionitis in Prematurity. *The New England Journal of Medicine*. 1988, (319), 972-978.
- [41] ROMERO, Roberto, et. al. VIII. Microbial invasion of the amniotic cavity in patients with suspected cervical incompetence: Prevalence and clinical significance. *America Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1992, **167**(4), 1086-1091.
- [42] DIGIULIO, Daniel B., et. al. Prevalnce and Diversity of Microbes in the Amniotic Fluid, the Fetal Inflammatory Response, and Pregnancy Outcome in Women Preterm Pre-Labor Rupture of Membranes. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2010, (64), 38-57.
- [43] BECHER, Naja, et al. The cervical mucus plug: structured review of the literature. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 2009, 88.5: 502-513.
- [44] JEFFERSON, Kimberly K, et. al. The Bacterial Etiology of Preterm Birth. *Advances in Applied Microbiology* . 2012, **80**, 1-22.
- [45] HEIN, Merete, et. al. Antimicrobial factors in the cervival mucus plug. *America Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002, **187**(1), 137-144.
- [46] BRISELDEN, Ann Marie, et. al. Sialidases (Neuroaminidases) in Bacterial Vaginosis and Bacterial Vaginosis-Associated Microflora. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992, **30**(3), 663-666.
- [47] HOWE, Lynn, et. al. Mucinase and sialidase activity of the vaginal microflora: implications for the pathogenesis of preterm labour. *International Journal of STD & AIDS*. 1999, **10**, 442-447.
- [48] MAŠATA, Jaromír, et. al. Antibiotická léčba a profylaxe některých infekcí v těhotenství. *Klin Farmakol a Farm*, 2008, 22.4: 137-141.



- [49] VELEMÍNSKÝ, et.al. Management of pregnancy with premature rupture of membranes (PROM). *J Health Sci Management Public Health*, 2006, 192-7.
- [50] HERGLOVÁ, Marina. *Předčasný odtok plodové vody*. Pardubice, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
- [51] ABDELAZIM, Ibrahim A., et. al. Fetal fibronectin (Quick Check fFN test ) for detection of premature rupture of fetal membranes. *Archives of Gynecology and OBstetrics*. (287), 205-210.
- [52] CAUGHEY, Aaron B., et al. Contemporary diagnosis and management of preterm premature rupture of membranes. *Reviews in obstetrics and gynecology*, 2008, 1.1: 11.
- [53] CIEŚLIK, Paweł, et al. Long pentraxin 3 (PTX3) in the light of its structure, mechanism of action and clinical implications. *Autoimmunity* [online]. 2011, **45**(2), 119-128].
- [54] PRESTA, Marco, et al. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2007, **11**(4), 723-738.
- [55] KUNES, P., et al. Pentraxin 3(PTX 3): An Endogenous Modulator of the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation* [online]. 2012, **2012**, 1-10.
- [56] BOTTAZZI, Barbara, et al. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. *Journal of hepatology*, 2016, 64.6: 1416-1427.
- [57] INFORZATO, Antonio, et al. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry*, 2006, 45.38: 11540-11551.
- [58] BOTTAZZI, Barbara, et al. The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity. *Immunological reviews*, 2009, 227.1: 9-18.
- [59] DAIGO, Kenji, et.al. The protective effect against extracellular histones afforded by long-pentraxin PTX3 as a regulator of NETs. *Frontiers in immunology*, 2016, 7: 344.

- [60] DONI, Andrea, et al. The long pentraxin PTX3 as a link between innate immunity, tissue remodeling, and cancer. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 712.
- [61] UniProtKB - P26022 (PTX3\_HUMAN). *UniProt* [online]. Uniprot Consortium, 2020. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P26022>
- [62] DONI, Andrea; et.al. Innate immunity, hemostasis and matrix remodeling: PTX3 as a link. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, 2016. p. 570-577.
- [63] INFORZATO, Antonio, et al. Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283.15: 10147-10161.
- [64] JAILLON, Sébastien, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204.4: 793-804.
- [65] MOALLI, Federica, et al. Pathogen Recognition by the Long Pentraxin PTX3. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2011, **2011**, 1-15 [cit. 2020-07-15].
- [66] PERI, Giuseppe, et al. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation*, 2000, 102.6: 636-641.
- [67] NORATA, Giuseppe Danilo, et al. Deficiency of the long pentraxin PTX3 promotes vascular inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2009, 120.8: 699.
- [68] DEBAN, Livija, et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nature immunology*, 2010, 11.4: 328-334.
- [69] MANTOVANI, Alberto, et al. The long pentraxin PTX3 in vascular pathology. *Vascular pharmacology*, 2006, 45.5: 326-33.
- [70] MANTOVANI, Alberto, et al. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *Journal of clinical immunology*, 2008, 28.1: 1-13.
- [71] INFORZATO, Antonio, et al. PTX3 as a paradigm for the interaction of pentraxins with the complement system. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, 2013. p. 79-85.
- [72] KOUSER, Lubna, et al. Properdin and factor h: opposing players on the alternative complement pathway “see-saw”. *Frontiers in immunology*, 2013, 4: 93.

- [73] GARLANDA, Cecilia, et al. PTX3, a humoral pattern recognition molecule at the interface between microbe and matrix recognition. *Current opinion in immunology*, 2016, 38: 39-44.
- [74] DONI, Andrea, et al. Interactions of the humoral pattern recognition molecule PTX3 with the complement system. *Immunobiology*, 2012, 217.11: 1122-1128.
- [75] GOUT, Evelyne, et al. M-ficolin interacts with the long pentraxin PTX3: a novel case of cross-talk between soluble pattern-recognition molecules. *The Journal of Immunology*, 2011, 186.10: 5815-5822.
- [76] PORTE, Remi, et al. The long pentraxin PTX3 as a humoral innate immunity functional player and biomarker of infections and sepsis. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 794.
- [77] JAILLON, S., et al. Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. *Cell Death & Differentiation*, 2009, 16.3: 465-474.
- [78] ROVERE, Patrizia, et al. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2000, 96.13: 4300-4306.
- [79] ALLOUCHE, Michele, et. al. The role of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in hematopoiesis. *Progress in growth factor research*, 1995, 6.1: 35-48.
- [80] OKADA-BAN, Mai, et.al. Fibroblast growth factor-2. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2000, 32.3: 263-267.
- [81] BIKFALVI, Andreas, et al. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine reviews*, 1997, 18.1: 26-45.
- [82] RUSNATI, Marco, et. al. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long Pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*, 2004, 104.1: 92-99.
- [83] CAMOZZI, Maura, et al. Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281.32: 22605-22613.

- [84] ALESSI, Patrizia, et al. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. *European cytokine network*, 2009, 20.4: 225-234.
- [85] INFORZATO, Antonio, et. al. The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285.23: 17681-17692.
- [86] ZLIBUT, Alexander, et. al. Pentraxin-3 and endothelial dysfunction. *Advances in Clinical Chemistry*. 2019, 91: 163-179.
- [87] LORANT, Diane E., et al. Inflammatory roles of P-selectin. *The Journal of clinical investigation*, 1993, 92.2: 559-570.
- [88] LARSEN, Glenn R., et. al. P-selectin and E-selectin distinct but overlapping leukocyte ligand specificities. *The journal of Biological and Chemistry*, 1992, 267.16:11104-11110.
- [89] HANLEY, William, et. al. Single molecule characterization of P-selectin/ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278.12:10556-10561.
- [90] RIDKER, Paul M., et. al. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. 2001, 103:491-495.
- [91] DAY, Anthony J., et. al. TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biology*. 2018, 78: 60-83.
- [92] MOORE, Kevin L., et. al. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269.37: 23318-23327.
- [93] DEBAN, Livija, et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nature immunology*, 2010, 11.4: 328-334.
- [94] Milner, Caroline M., et. al. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *Journal of Cell Science*. 2003, 116: 1863-1873.
- [95] MAINA, Virginia, et al. Coregulation in human leukocytes of the long pentraxin PTX3 and TSG-6. *Journal of leukocyte biology*, 2009, 86.1: 123-132.
- [96] MILNER, Caroline M., et. al. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? *Biochemical Society Transaction*. 2006, 34.3: 446-450.

- [97] WISNIEWSKI, Hans-Georg, et. al. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 2004, 15: 129-146.
- [98] BARANOVA, Natalia S., et. al. Incorporation of Pentraxin 3 into hyaluronan matrix is tightly regulated and promotes matrix cross-linking. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014,289.44: 30481-30498.
- [99] WISNIEWSKI, Hans-Georg, et. al. TSG-6: An IL-1/TNF- Inducible protein with anti-inflammatory activity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 1997, 8.2: 143-156.
- [100] JAILLON, Sébastien, et. al. The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infection. *Immunity*. 2014, 40: 621-632.
- [101] CIANCARELLA, Valeria, et. al. Role of a fluid-phase PRR in fighting an intracellular pathogen: PTX3 in Shigella infection. *PLoS Pathogens*. 2018, 14: 1-27.
- [102] PORTE, Rémi. The long pentraxin PTX3 as a humoral innate immunity functional player and biomarker of infections and sepsis. *Frontiers in immunology*. 2019, 10: 1-11.
- [103] PARONI, Moira, et. al. Response of CFTR-deficient mice to long-term chronic Pseudomonas aeruginosa infection and PTX3 therapy. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013, 208: 130-138.
- [104] SOARES, Adriana C., et. al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with Klebsiella pneumoniae in transgenic mice. *Microbes and Infection*. 2006, 8: 1321-1329.
- [105] BOTTAZZI, Barbara, et. al. Recognition of Neisseria meningitidis by the long pentraxin PTX3 and its role as an endogenous adjuvant. *PLoS ONE*. 2015, 10.3: e0120807
- [106] HUTTUNEN, Reetta, et. al. High plasma level of long Pentraxin 3 (PTX3) is associated with fatal disease in bacteremic patients: a prospective cohort study. *PLoS ONE*. 2011, 6.3: e17653.
- [107] DE KRUIF, Martijn D., et. al. PTX3 predicts severe disease in fibrile patients at the emergency department. *Journal of Infection*. 2010, 60: 122-127.

- [108] WAGENAAR, Jiri F. P., et. al. Long Pentraxin PTX3 is associated with mortality and disease severity in severe leptospirosis. *Journal of Infection*. 2009, 58: 425-432.
- [109] MAGRINI, Elena, et. al. The dual complexity of PTX3 in health and disease: a balancing act? *Trends in Molecular Medicine*. 2016, 22.6: 497-510.
- [110] DINIZ, S. N., et. al. PTX3 function as an opsonin for dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004, 75: 649-656.
- [111] CAMPOS, Cláudia F., et. al. PTX3 polymorphism influence cytomegalovirus reactivation after stem-cell transplantation. *Frontiers in Immunology*. 2019, 10: 1-8.
- [112] BOZZA, Silvia, et. al. PTX3 binds MD-2 and promotes TRIF-dependent immune protection in aspergillosis. *The Journal of Immunology*. 2014, 193: 2340-2348.
- [113] WÓJTOWICZ, Agnieszka, et. al. PTX3 polymorphism and invasive mold infection after solid organ transplant. *Clinical Infectious Diseases*. 2015, 61.4: 619-622.
- [114] MAGRINI, Elena, et.al. The dual complexity of PTX3 in health and disease: a balancing act?. *Trends in molecular medicine*, 2016, 22.6: 497-510.
- [115] GARLANDA, Cecilia, et. al. Non-redundant of the long Pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*. 2002, 420.14: 182-186.
- [116] BIAGI, Ettore, et. al. PTX3 as a potential novel tool for diagnosis and monitoring of pulmonary fungal infections in immuno-compromised pediatric patients. *Journal of pediatric hematology/onkology*. 2008, 30: 881-885.
- [117] GARLANDA, Cecilia, et. al. Inflammatory reaction and implantation: the new entries PTX3 and D6. *Placenta*. 2008, 29: S129-S134.
- [118] LARSSON, Anders, et. al. Pentraxin 3 values during normal pregnancy. *Inflammation*. 2011, 34.5: 448-451.
- [119] ROVEERE-QUERINI, Patrizia, et. al. Plasma and tissue expression of the long Pentraxin during normal pregnancy and preeclampsia. *Obstetric & Gynecology*. 108. 1:148-155.

- [120] ROVERE-QUERINI, Patrizia, et. al. Signals of death and tissue turnover during physiological pregnancy, pre-eclampsia, and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2007, 40.4: 290-294.
- [121] MARTIN, Laura F., et al. Pentraxin-3 concentration in the amniotic fluid of women at term, in spontaneous preterm labor and when not in labor. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2014, 176: 86-89.
- [122] EILAND, Elosa, et. a. Preeclampsia. *Journal of Pregnancy*. 2012, 2012: 586578.
- [123] RESNIK, Robert. Intrauterine growth restriction. *Obstetrics & Gynecology*, 2002, 99.3: 490-496.
- [124] ZHOU, Ping, et. al. The expression of Pentraxin 3 and tumor necrosis factor-alpha is increased in preeclamptic placental tissue and maternal serum. *Inflammation Research*. 2012, 61: 1005-1012
- [125] THAN, Nandor Gabor, et al. Prediction of preeclampsia—a workshop report. *Placenta*, 2008, 29: 83-85.
- [126] COZZI, V., et. al. PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR. *Placenta*. 2012, 33: 1039-1044.
- [127] CRUCIANI, Laura, et. al. Pentraxin 3 in maternal circulation: an association with preterm labor and preterm PROM, but not with intra-amniotic infection/inflammation. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2010, 23.10: 1097-1105.
- [128] KACEROVSKY, Marian, et al. Pentraxin 3 in amniotic fluid as a marker of intra-amniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2010, 108.3: 203-206.
- [129] MUSILOVA, Ivana, et. al. Amniotic fluid pentraxins: potential early markers for identifying intra-amniotic inflammatory complications in preterm pre-labor rupture of membranes. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2018, 79.5: e12789.
- [130] JANKU, Petr, et al. Pentraxin 3 in noninvasively obtained cervical fluid samples from pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *Fetal diagnosis and therapy*, 2019, 46.6: 402-410.

- [131] IBRAHIM, Moustafa I., et al. The association between pentraxin 3 in maternal circulation and pathological intrauterine fetal growth restriction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2015, 185: 1-8.
- [132] RUBINO, Marcello, et al. Epigenetic regulation of the extrinsic oncosuppressor PTX3 gene in inflammation and cancer. *Oncoimmunology*, 2017, 6.7: e1333215.
- [133] BONAVIDA, Eduardo, et.al. PTX3 acts as an extrinsic oncosuppressor. *Oncotarget*, 2015, 6.32: 32309.
- [134] BONAVIDA, Eduardo, et al. PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer. *Cell*, 2015, 160.4: 700-714.
- [135] CHOI, Bongkun, et al. Pentraxin-3 silencing suppresses gastric cancer-related inflammation by inhibiting chemotactic migration of macrophages. *Anticancer research*, 2015, 35.5: 2663-2668.
- [136] CHI, Jhih-Ying, et al. Targeting chemotherapy-induced PTX3 in tumor stroma to prevent the progression of drug-resistant cancers. *Oncotarget*, 2015, 6.27: 23987.
- [137] GARLANDA, Cecilia, et al. PTX3, a humoral pattern recognition molecule, in innate immunity, tissue repair, and cancer. *Physiological reviews*, 2018, 98.2: 623-639.
- [138] TARANTINO, Umberto, et al. The Role of PTX3 in Mineralization Processes and Aging-Related Bone Diseases. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 3718.
- [139] CHOI, Bongkun, et al. Elevated Pentraxin 3 in bone metastatic breast cancer is correlated with osteolytic function. *Oncotarget*, 2014, 5.2: 481.
- [140] CHANG, Wei-Chiao, et al. PTX3 gene activation in EGF-induced head and neck cancer cell metastasis. *Oncotarget*, 2015, 6.10: 7741.
- [141] LOCATELLI, Marco, et al. The long pentraxin PTX3 as a correlate of cancer-related inflammation and prognosis of malignancy in gliomas. *Journal of neuroimmunology*, 2013, 260.1-2: 99-106.
- [142] MATARAZZO, Sara, et al. Long pentraxin-3 follows and modulates bladder cancer progression. *Cancers*, 2019, 11.9: 1277.



- [143] RONCA, Roberto, et al. Long pentraxin-3 as an epithelial–stromal fibroblast growth factor-targeting inhibitor in prostate cancer. *The Journal of pathology*, 2013, 230.2: 228-238.
- [144] LEALI, Daria, et al. Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone–regulated tumors. *Molecular cancer therapeutics*, 2011, 10.9: 1600-1610.
- [145] DONI, Andrea, et al. Humoral innate immunity at the crossroad between microbe and matrix recognition: The role of PTX3 in tissue damage. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2017. p. 31-40.
- [146] RESNIK, Robert. Intrauterine growth restriction. *Obstetrics & Gynecology*, 2002, 99.3: 490-496.
- [147] GRČEVIĆ, Danka, et al. The long pentraxin 3 plays a role in bone turnover and repair. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 417.
- [148] LEE, Eun-Jin, et al. PTX3 stimulates osteoclastogenesis by increasing osteoblast RANKL production. *Journal of cellular physiology*, 2014, 229.11: 1744-1752.
- [149] HAGE, David S. Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical chemistry*, 1999, 45.5: 593-615.
- [150] MOSER, Annette C.; HAGE, David S. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis*, 2010, 2.4: 769-790.
- [151] SUBRAMANIAN, Anuradha. Immunoaffinity chromatography. *Molecular biotechnology*, 2002, 20.1: 41-47.
- [152] FITZGERALD, Jenny, et al. Immunoaffinity chromatography. *Protein Chromatography*, 2011, 35-59.
- [153] OLSVIK, Orjan, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 1994, 7.1: 43-54.
- [154] HAUKANES, Bjørn-Ivar, et. al. Application of magnetic beads in bioassays. *Bio/technology*, 1993, 11.1: 60-63.
- [155] UGELSTAD, J., et al. Preparation and application of new monosized polymer particles. *Progress in Polymer Science*, 1992, 17.1: 87-161.

- [156] BERENSMEIER Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 73.3: 495-504.
- [157] UGELSTAD, John, et al. Preparation and application of monodisperse polymer particles. In: *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*, 1985, 72: 225-240.
- [158] MEHTA, R. V., et al. Direct binding of protein to magnetic particles. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11.7: 493-496.
- [159] THOMAS, Julian A., et al. Immunomagnetic separation of microorganisms with iron oxide nanoparticles. *Chemosensors*, 2020, 8.1: 17.
- [160] KÖKPINAR, Öznur, et al. Aptamer-based downstream processing of his-tagged proteins utilizing magnetic beads. *Biotechnology and bioengineering*, 2011, 108.10: 2371-2379.
- [161] JUNG, Yongwon, et al. Controlled antibody immobilization onto immunoanalytical platforms by synthetic peptide. *Analytical Biochemistry*, 2008, 374.1: 99-105.
- [162] ZHANG, Hairong, et.al. Gold-coated magnetic particles for solid-phase immunoassays: enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance. *Analytical chemistry*, 2006, 78.2: 609-616.
- [163] SAMANTA, Avik, et. al. Magnetic Separation of Proteins by a Self-Assembled Supramolecular Ternary Complex. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53.47: 12946-12950.
- [164] HE, Jincan, et al. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: a review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2014, 101: 84-101.
- [165] WIDJOATMODJO, Myra N., et al. Comparison of immunomagnetic beads coated with protein A, protein G, or goat anti-mouse immunoglobulins Applications in enzyme immunoassays and immunomagnetic separations. *Journal of immunological methods*, 1993, 165.1: 11-19.
- [166] JILES, D. C. Recent advances and future directions in magnetic materials. *Acta materialia*, 2003, 51.19: 5907-5939.

- [167] BAS, J. A., et. al. Sintered soft magnetic materials. Properties and applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2003, 254: 391-398.
- [168] YAMATO, Masafumi, et. al. Magnetic Processing of Diamagnetic Materials. *Polymers*, 2020, 12.7: 1491.
- [169] SIMON, M. D., et.al. Diamagnetic levitation: Flying frogs and floating magnets. *Journal of applied physics*, 2000, 87.9: 6200-6204.
- [170] BOZORTH, Richard M. Magnetism. *Reviews of Modern Physics*, 1947, 19.1: 29.
- [171] WOHLFARTH, E. P. Hard magnetic materials. *Advances in physics*, 1959, 8.30: 87-224.
- [172] FIDLER, Josef, et al. Recent developments in hard magnetic bulk materials. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2004, 16.5: S455.
- [173] KIRCHMAYR, H. R. Permanent magnets and hard magnetic materials. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 1996, 29.11: 2763.
- [174] LIVINGSTON, J. D. The history of permanent-magnet materials. *JOM*, 1990, 42.2: 30-34.
- [175] FIORILLO, Fausto, et al. Soft magnetic materials. *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*, 1999, 1-42.
- [176] HERZER, Giselher. Nanocrystalline soft magnetic materials. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1996, 157: 133-136.
- [177] SHOKROLLAHI, H. E. J. K., et. al. Soft magnetic composite materials (SMCs). *Journal of Materials Processing Technology*, 2007, 189.1-3: 1-12.
- [178] BRUG, James A., et. al. Magnetic recording head materials. *MRS Bulletin*, 1996, 21.9: 23-27.
- [179] DADFAR, Seyed Mohammadali, et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced drug delivery reviews*, 2019, 138: 302-325.

- [180] SCHÜTT, W., et al. Applications of magnetic targeting in diagnosis and therapy—possibilities and limitations: a mini-review. *Hybridoma*, 1997, 16.1: 109-117.
- [181] NIEMIROWICZ, K., et al. Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine. *Advances in medical sciences*, 2012, 57.2: 196-207.
- [182] OLSVIK, Orjan, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 1994, 7.1: 43-54.
- [183] ARRUEBO, Manuel, et al. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano today*, 2007, 2.3: 22-32.
- [184] PRICE, Paige M., et al. Magnetic drug delivery: where the field is going. *Frontiers in chemistry*, 2018, 6: 619.
- [185] MODY, Vicky V., et al. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Applied Nanoscience*, 2014, 4.4: 385-392.
- [186] ARRUEBO, Manuel, et al. Development of magnetic nanostructured silica-based materials as potential vectors for drug-delivery applications. *Chemistry of Materials*, 2006, 18.7: 1911-1919.
- [187] PANKHURST, Quentin A., et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 2003, 36.13: R167.
- [188] LÜBBE, Andreas S., et. al. Clinical applications of magnetic drug targeting. *Journal of Surgical Research*, 2001, 95.2: 200-206.
- [189] MARKIDES, H., et. al. Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 2012.
- [190] HERMANSON, Greg T. *Bioconjugate Techniques*. 2. USA: Elsevier. ISBN 0123822408, 9780123822406.
- [191] SUROLIA, Avadhesh, et. al. Protein A: nature's universal anti-antibody. *Trends in Biochemical Sciences*, 1982, 7.2: 74-76.
- [192] KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A., et al. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. *Analytical chemistry*, 2010, 82.15: 6401-6408.

[193] PHILLIPS, Terry M. *Analytical Techniques in Immunochemistry*. CRC Press, 1991, s. 364. ISBN 0824784774, 9780824784775.

[194] DUNDAS, Christopher M., et. al. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2013, 97.21: 9343-9353.