

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2022 Bc. Barbora Hamerníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Proteomická analýza biomarkeru receptivity
endometria**

Diplomová práce

Bc. Barbora Hamerníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Barbora HAMERNÍKOVÁ
Osobní číslo: R20905
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Proteomická analýza biomarkeru receptivity endometria
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Studentka se bude podílet na projektu BIOMER financovaného z AZV. Obsahem práce bude analýza vzorků cervikálního hlenu získaného v předchozím období. Těžištěm práce bude discovery fáze pomocí necílené proteomické analýzy. V této fázi očekáváme 100 – 200 vzorků. Studentka se bude podílet na přípravě vzorků, jejich analýze a zejména vyhodnocování a statistické analýze.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Fernandez-Hermida Y, Grande G, Menarguez M, Astorri AL, Azagra R. Proteomic Markers in Cervical Mucus. *Protein Pept Lett.* 2018;25(5):463-471. doi: 10.2174/0929866525666180418122705. PMID: 29667544
Dvořan M, Vodička J, Dostál J, Hajdůch M, Džubák P, Pešková M, Pilka R. Implantation and diagnostics of endometrial receptivity. *Ceska Gynekol.* 2018 Fall;83(4):291-298. PMID: 30441961

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 29. října 2020
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2021

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901

L.S.

-2-

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Hamerníková
Název práce	Proteomická analýza biomarkeru receptivity endometria
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Klíčová slova	proteomika, hmotnostní spektrometrie, IVF, neplodnost
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	Český

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá proteomickou analýzou vzorků cervikálního hlenu s ohledem na potenciální identifikaci možných biomarkerů receptivity endometria. Nízká úspěšnost *In vitro* fertilizace je velmi známým a častým problémem celého procesu. Nejen, že má negativní vliv na budoucí rodiče, ale také výrazně zvyšuje finanční náročnost léčby.

V této práci je uveden postup necílené proteomické analýzy s bioinformatickým zpracováním dat. V rámci analyzovaných vzorků došlo k vyčlenění skupiny zahrnující pouze těhotné pacientky. U těchto vzorků byly identifikovány specifické proteiny pro různé fáze ovulace: Annexin A1 a Apolipoprotein II (pre-ovulační fáze), Mucin-5AC (ovulační fáze) a Keratin I (post-ovulační fáze).

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Bc. Barbora Hamerníková
Title	Proteomic discovery of endometrial receptivity biomarker
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
The year of presentation	2022
Keywords	proteomics, mass spectrometry, IVF, infertility
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Czech

SUMMARY

This diploma thesis deals with the proteomic analysis of cervical mucus samples and the potential identification of possible biomarkers of endometrial receptivity. Low success rate of *In vitro* fertilization is a well-known and very common problem of the whole process. Not only that it has a negative effect on both future parents, but it also significantly increases the financial demands of the treatment.

The non-targeted proteomic workflow with bioinformatic data processing is presented in this thesis. Within the analysed samples a group containing only pregnant patients was separated. And specific proteins for the different phases of ovulation were identified in these samples: Annexin A1, Apolipoprotein II (pre-ovulation phase), Mucin-5AC (ovulation phase) and Keratin I (post-ovulation phase).

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, s pomocí vedoucího práce Mgr. Tomáše Oždiana, Ph.D. a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci:

Podpis:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce, Mgr. Tomáši Oždianovi, Ph.D., za rady, pomoc a trpělivost po celou dobu naší spolupráce. Dále bych ráda poděkovala rodině a přátelům za podporu. Tato práce byla vypracována v rámci grantu AZV ČR (NV18-08-00291).

OBSAH

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Proces oplodnění.....	3
3.1.1	Vývoj gamet a oplodnění.....	3
3.2	Neplodnost a její léčba	5
3.2.1	<i>In vitro</i> fertilizace (IVF)	6
3.3	Děloha.....	9
3.3.1	Endometrium	9
3.3.2	Cervikální hlen	10
3.4	Proteomika.....	11
3.5	Hmotnostní spektrometrie	12
3.5.1	Kvadrupól	14
3.5.2	Orbitrap.....	14
3.5.3	Label-free metody.....	15
3.6	Bioinformatická analýza dat.....	16
3.6.1	Databáze	16
3.6.2	Vyhledávací algoritmy	16
3.6.3	Programy pro zpracování dat.....	17
3.7	Diagnostika v oblasti léčby neplodnosti.....	18
3.7.1	Diagnostika receptivity endometria.....	18
3.7.2	Diagnostické metody pro vyšetření spermií a ženského pohlavního ústrojí .	19
3.7.3	Studie panelu biomarkerů přítomných v cervikálním hlenu	20
4	Materiál a metody	21
4.1	Biologický materiál	21
4.2	Přístroje a zařízení	21
4.3	Software.....	21
4.4	Chemikálie.....	21
4.5	Soupravy	22
4.6	Roztoky.....	22

4.7	Použité experimentální a vyhodnocující postupy	23
4.7.1	Příprava vzorků.....	23
4.7.2	Štěpení proteinů na membráně (FASP)	23
4.7.3	Precipitace detergentů.....	24
4.7.4	Purifikace peptidů.....	24
4.7.5	LC-MS/MS analýza	24
4.7.6	Zpracování dat a vyhodnocení v programu Proteome Discoverer	25
4.7.7	Zpracování dat a vyhodnocení v programech MaxQuant a Perseus	26
5	Výsledky	27
5.1	Vyhodnocení v programu Proteome Discoverer	30
5.2	Vyhodnocení v programech MaxQuant a Perseus	33
5.3	Srovnání výsledků vyhledávání	36
5.4	Analýza získaných výsledků	37
6	Diskuse	40
7	Závěr	44
8	Literatura	45

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	Kyselina octová
ACN	Acetonitril
ALICE	Analýza infekční chronické endometriózy
BSA	Hovězí sérový albumin
hCG	Lidský choriový gonadotropin
DDA	Data dependentní akvizice
DIA	Data independentní akvizice
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EMMA	Metagenomická analýza endometriálního mikrobiomu
ERA	Analýza receptivity endometria
eSET	Efektivní transfer jednoho embrya
ESI	Ionizace elektrosprejem
FASP	Příprava vzorků pomocí filtru
FT	Fourierova transformace
GC	Plynová chromatografie
GnRH	Gonadotropin uvolňující hormon
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
HPV	Lidský papilloma virus
ICAT	Izotopově kódované afinitní značky
IDCR	Činidlo pro kompatibilitu s ionogenními detergenty
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermie
iTRAQ	Izobarické značení pro relativní a absolutní kvantifikaci
LH	Luteinizační hormon
LC	Kapalinová chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MALDI	Laserová desorpce/ionizace s účastí matrice
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NGS	Sekvenování nové generace
OHSS	Ovariální hyperstimulační syndrom

PCA	Analýza hlavní komponenty
PTM	Post-translační modifikace
PZD	Parciální disekce <i>zony pellucidy</i>
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SDS	Dodecylsírán sodný
SILAC	Stabilní izotopové značení aminokyselinami v buněčné kultuře
SRM	Monitorování vybraných reakcí
TFA	Kyselina trifluoroctová
TLM	Časoběrná mikroskopie
TOF	Doba letu
TVOR	Transvaginální odběr oocytů
WHO	Světová zdravotnická organizace
WOI	Implantační okno
ZP1/2	Glykoproteiny <i>zony pellucidy</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Tři fáze proniknutí spermie do vajíčka.

Obrázek 2: Hlavní technologie používané v asistované reprodukci: ICSI a IVF.

Obrázek 3: Děložní sliznice v průběhu ovariálního cyklu.

Obrázek 4: Základní komponenty hmotnostního spektrometru.

Obrázek 5: Schéma analyzátoru typu Orbitrap.

Obrázek 6: Zjednodušený vývojový diagram SEQUEST algoritmu popisující proces, kterým jsou poskytována skóre pro identifikaci peptidů.

Obrázek 7: Diagnostika pomocí ERA testu.

Obrázek 8: Závislost absorbance na koncentraci standardů pro výpočet neznámých koncentrací vzorků cervikálního hlenu.

Obrázek 9: Závislost absorbance na koncentraci vzorků standardů pro zjištění objemů vzorků s obsahem 10 mg peptidu.

Obrázek 10: Graf znázorňující počty identifikovaných proteinů v jednotlivých vzorcích.

Obrázek 11: Graf počtu identifikovaných proteinů v jednotlivých vzorcích po odstranění vzorků s minimálními počty

Obrázek 12: Heat mapa výsledků vzorků cervikálního hlenu vytvořena v programu Proteome Discoverer.

Obrázek 13: Analýza hlavní komponenty pro vzorky cervikálního hlenu provedena v programu Proteome Discoverer.

Obrázek 14: Histogramy znázorňující intenzity proteinů v jednotlivých vzorcích cervikálních hlenů vytvořené v programu Perseus.

Obrázek 15: Heat mapa výsledků vzorků cervikálního hlenu vytvořena v programu Perseus.

Obrázek 16: Analýza hlavní komponenty pro vzorky cervikálního hlenu provedena v programu Perseus.

Obrázek 17: Vennův diagram znázorňující počet identifikovaných proteinů pouze v programu MaxQuant (MQ), pouze v programu Proteome Discoverer (PD) a proteinů identifikovaných v obou programech (MQ \cap PD).

Obrázek 18: Analýza proteinů podle gene ontology (GO) anotací molekulárních funkcí.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Koncentrace proteinů ve vzorcích cervikálního hlenu.

Tabulka 2: Množství vzorků v μg pro aplikaci na membránu pro FASP.

Tabulka 3: Objemy vzorků s obsahem 10 μg peptidu (vz. 65 a 104: 5 μg peptidu).

Tabulka 4: Proteiny s nejvyšší intenzitou u vzorků vybraných těhotných pacientek (ID vzorku: 17, 36, 56 a 57).

Tabulka 5: Identifikované proteiny vzorků vybraných těhotných pacientek (ID vzorku: 17, 36, 57 a 58) rozdělené na základě exprese dle fáze ovulačního cyklu.

1 ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá problematikou úspěšnosti *In vitro* fertilizace (IVF), jejímž cílem je početí a narození alespoň jednoho dítěte v rámci léčebného cyklu. Úspěšnost jednoho pokusu se pohybuje okolo 30 % a méně. I přes dodržování validovaných a reprodukovatelných postupů není překročena hranice 50 % ani u párů s optimální prognostikou (Somigliana *et al.*, 2021).

Implementace nových technik a inovací, vedoucích k rychlejšímu oplodnění a porodu s minimálními riziky, je možná jen v případě, že specializovaná klinika dosahuje definovaných výsledků výkonnosti. Nové přístupy a inovace stávajících metod jsou v praxi velmi žádoucí, ovšem je nutno podotknout finanční náročnost těchto změn. Není tedy možné zavádět do praxe postupy, u kterých je pouze malá pravděpodobnost úspěšnosti v rámci léčebného procesu. Hledání rychlých, efektivních a nepříliš finančně náročných metod je v tomto oboru klíčové (Rienzi *et al.*, 2021).

V mnoha aspektech IVF by mohlo pomoci nalézt marker definující aktuální stav vnitřního prostředí ženy (např. receptivity endometria). Objev takového markeru by mohl usnadnit přesnější načasování implantace embrya, čímž by došlo ke zvýšení efektivity procesu. Rovněž by ženy nebyly vystaveny tak velké stresové zátěži a samozřejmě by došlo také ke snížení finančních nákladů léčebné procedury (Timeva *et al.*, 2014).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je analýza vzorků cervikálních hlenů pomocí necílené proteomické analýzy a zejména pak vyhodnocování a statistická analýza získaných dat.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Proces oplodnění

Oplodnění je proces splývání mužských a ženských pohlavních buněk neboli gamet, nesoucích dědičnou genetickou informaci, jehož výsledkem je vznik zygoty (Georgadaki *et al.*, 2016). Interakce mezi gametami a následné oplodnění jsou vysoce regulované procesy. Správný vývoj a interakce gamet jsou zajištěny mnoha dlouhými, náročnými a koordinovanými procesy během gametogeneze, na jejichž konci dochází ke snížení počtu chromozomů buněk na polovinu, přičemž po splynutí dvou haploidních gamet vzniká diploidní zygota. Kromě gametogeneze buňky podstupují také cytodiferenciaci, která zakončuje proces zrání (Sadler, 2011; Talevi *et Gualtieri*, 2004).

I přes to, že během produkce gamet u obou pohlaví dochází k téměř stejným biologickým procesům, reakce vedoucí k aktivaci schopnosti oplodnění jsou odlišné. Výsledkem diference gamet u žen je omezené množství oocytů připravených k oplodnění, zatímco u mužů je to velké množství spermií, které ale musí projít kapacitací, aby získaly schopnost vajíčko oplodnit (Okabe, 2014; Talevi *et Gualtieri*, 2004).

3.1.1 Vývoj gamet a oplodnění

K dozrání spermií dochází v období puberty v procesu zvaném spermatogeneze. Na počátku se z kmenových buněk vyvíjí spermatogonie A, jejichž dělením vznikají spermatogonie B. Dělením jsou dále tvořeny spermatocyty a je dokončeno I. meiotické dělení za vzniku sekundárních spermatocytů. Během II. meiotického dělení vznikají haploidní spermatidy, které jsou dále v průběhu spermiogeneze přeměněny na spermie. Dochází například k tvorbě akrozomu obsahujícího enzymy nutné k průniku do vajíčka, nebo k vytvoření krčku a bičíku. Celý proces zrání trvá přibližně 74 dní, přičemž za jeden den je vyprodukováno až 300 milionů spermií.

Zrání oocytů je započato již během prenatálního vývoje, kdy se prvopohlavní buňky vyvíjí v oogonie podstupující řadu mitotických dělení. Několik z těchto oogonií pozastaví svůj vývoj v profázi I. meiotického dělení, čímž vznikají primární oocyty. Před porodem vstupují primární oocyty do klidové fáze diplotene, v níž setrvávají až do období puberty.

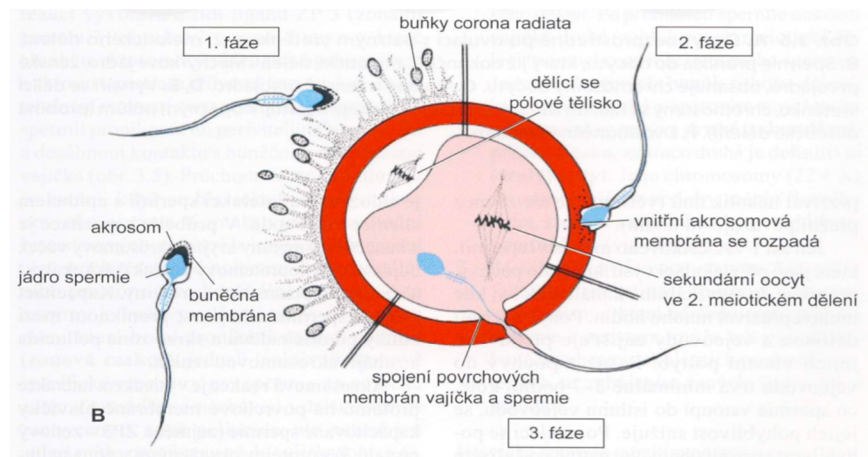
V období puberty dochází každý měsíc v rámci ovariačního cyklu k dozrání několika folikulů ve třech po sobě nastupujících stádiích: primárním, sekundárním a pre-ovulačním.

Výsledkem pre-ovulační fáze je dozrání jednoho sekundárního folikulu, což navodí zvýšení hladiny luteinizačního hormonu (LH) a růstovou fází. Produktem je sekundární oocyt s pólovým tělískem a spuštění II. meiotické dělení, které může být dokončeno pouze, dojde-li k oplodnění vajíčka spermií, jinak dochází k degeneraci buňky.

V období ovulace je oocyt uvolněn z folikulu vlivem zvýšené hladiny LH, a buňky, které uvolněny nebyly, jsou přeměněny v luteinní buňky. Ty jsou základem pro žluté tělísko produkující progesteron. Ve spolupráci s estrogenními hormony vyvolává progesteron v endometriu sekreční fázi, vhodnou k implantaci a nidaci embrya. Mezitím je během 3-4 dnů oocyt peristalticky posouván vejcovodem směrem do dělohy. K samotnému procesu oplození dochází v nejširší oblasti vejcovodu u vaječníku, tzv. ampulární část vejcovodu, a má tři hlavní fáze (Sadler, 2011; Talevi *et* Gualtieri, 2004).

Při nechráněném pohlavním styku, při ejakulaci, je do vnitřního prostředí ženy uvolněno okolo 200–300 milionů spermií, z nichž přežije asi 1 % celkového počtu. Spermie musí z pochvy proniknout do dělohy a následně do prostoru vejcovodů, přičemž pohyblivost spermií je povzbuzována vlivem ovulace a hormonů, které ovlivňují aktivitu a kontraktilitu sekrečního epitelu děložního čípku, dělohy a vejcovodů. Oxytocin, uvolňující se při pohlavním styku, stimuluje kontraktilitu dělohy a vejcovodů, stejně jako prostaglandin. Během ovulace je děloha citlivější na působení těchto molekul.

Dochází také ke kapacitaci spermií a výsledkem této reakce je schopnost spermie prostoupit přes *corona radiata* k *zona pellucida* vajíčka. Spermie rozpoznává a váže se na glykoprotein *zony pellucidy* (ZP3 glykoprotein *zona pellucida*), dochází k akrozomové reakci. Protein pre-acrosin se váže na glykoprotein *zony pellucidy* ZP2, čímž dochází k jeho aktivaci, vzniká protein acrosin a dochází k rozrušení *zony pellucidy*. (Georgadaki *et al.*, 2016). V tuto chvíli je zároveň zabráněno průniku dalších spermií do vajíčka. Vzniká kontakt mezi membránami gamet, přičemž tato fúze je pravděpodobně indukována PH-30 spermatickým proteinem, a konečným krokem je splynutí gamet (Obrázek 1), což vede k dokončení II. meiotického dělení vajíčka za vzniku ženského prvojádra. Ze spermie se stává mužské prvojádro za současného oddělení bičíku, obě jádra se spojí a dochází k replikaci DNA (Sadler, 2011).



Obrázek 1: Tři fáze proniknutí spermie do vajíčka. Převzato ze Sadler, 2011.

Následuje fáze rýhování, zygota je rozdělena na dvě dceřiné buňky a dochází k mnoha mitotickým dělením, jejichž výsledkem je vznik menších blastomer. Asi po 3 dnech dělení je embryo tvořeno 16 buňkami a tento stav se označuje jako stádium moruly. Morula je tvořena vnitřní masou buněk tzv. embryoblastem, z něhož vzniká embryo a trofoblast, ze kterého se postupně vytváří plodové obaly a placenta. Jakmile morula vstoupí do dělohy, začne trofoblastem prostupovat tekutina a z moruly vzniká blastocysta. Okolo 6. dne po oplození, po rozpadu *zony pellucidy*, může být zahájena nidace regulovaná selektiny. Za současného působení integrinů produkovaných trofoblastem, lamininu a fibronektinu produkovaných endometriem pokračuje další vývoj embrya (Sadler, 2011).

3.2 Neplodnost a její léčba

Dle World Health Organization (WHO) je neplodnost definována jako neschopnost partnerů dosáhnout početí či donošení dítěte po roce a delší době pravidelného nechráněného pohlavního styku. U mužů jsou nejčastější příčiny neplodnosti vyvolány problémy s ejakulací, nízkou hladinou/absencí spermií nebo neobvyklou morfologií a pohybem spermií. U žen se jedná zejména o abnormality morfologie vaječníků, dělohy, vejcovodů, poruchy endokrinního systému či nadměrnou stresovou zátěž (“Infertility”, 2020).

Obecně bývá rozdělována na primární neplodnost, pokud nikdy nebylo dosaženo těhotenství, a na sekundární neplodnost, pokud bylo alespoň jednou oplodnění úspěšné a bylo dosaženo těhotenství (Benksim *et al.*, 2018).

Problémy s početím mohou mít mnoho různých příčin. Jedná se o morfologické defekty, ale i problémy na molekulární úrovni některé z mnoha reakcí, ke kterým dochází. Neplodnost mohou způsobovat problémy s expresí receptorů buněčné membrány vajíčka,

problémy při fúzi gamet, nesprávné dokončení II. meiotického dělení oocytu nebo i abnormality v remodelaci chromatinu (Georgadaki *et al.*, 2016), a proto je v současnosti kladen důraz na rozvoj a inovaci technik umělého oplodnění.

3.2.1 *In vitro* fertilizace (IVF)

První pokusy o *in vitro* fertilizaci, metodu, při které dochází k oplodnění vajíčka spermii mimo tělo matky, jsou datovány do roku 1878. Vídeňským embryologem Samuelem Leopoldem Schenkem byl proveden experiment s králíčími buňkami, přičemž bylo pozorováno přirozeně probíhající buněčné dělení po smíchání spermii a vajíček *in vitro*.

V roce 1951 bylo dvěma nezávisle na sobě pracujícími vědci, Collinem Russelem Austinem a Min Chueh Changem, potvrzeno, že pro získání schopnosti oplodnit vajíčko musí spermatozoa nejprve projít několika fázemi až do finálního období zralosti, a v roce 1959 byla Changem provedena úspěšná fertilizace králíka (Yanagimachi, 2016).

Metodu asistované reprodukce v 70. letech 20. století blíže představili Patrick Steptoe a Robert Edwards, jakožto možnou léčbu neplodnosti způsobenou poškozenými nebo neprůchodnými vaječníky. Už v roce 1968 byli schopni provést úspěšné oplodnění vajíčka spermii a dosáhnout tak buněčného dělení *in vitro*, ale až do roku 1978 nebyli schopni implantovat oplodněné vajíčko zpět do dělohy pacientky. Toho bylo dosaženo po zohlednění hormonální proměnlivosti v rámci dne a důležitosti správného načasování implantace, což v roce 1978 vedlo k porodu prvního tzv. ‘test tube‘ dítěte, Louise Brown (Steptoe *et* Edwards, 1978). O dva roky později bylo založeno první centrum IVF péče, Bourn Hall Clinic a už v roce 1986 se počet narozených dětí rovnal 1 000 (Zhao *et al.*, 2011).

Tento původní způsob *in vitro* fertilizace ovšem nebyl vhodný pro pacientky, u kterých nebyla neplodnost způsobena poškozenými vejcovody, ale vaječníky. Řešení bylo nalezeno v roce 1983 s využitím darovaných vajíček. Vajíčko dárkyně bylo oplodněno spermii manžela pacientky, vloženo do dělohy pacientky a úspěšně donošeno až do porodu (Wang *et* Sauer, 2006).

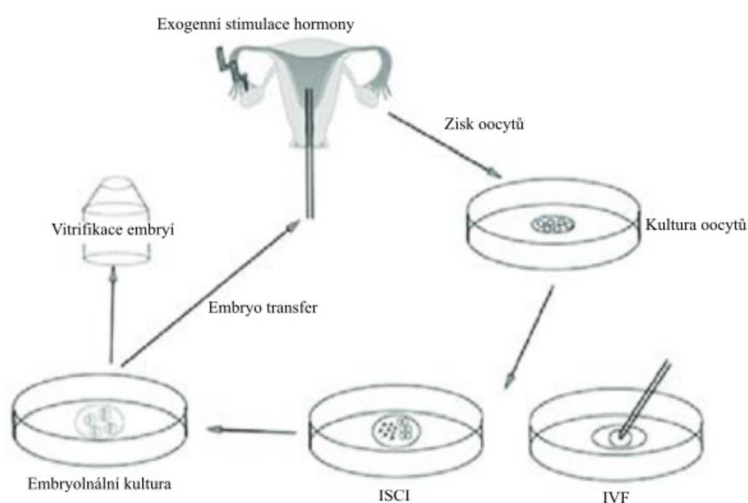
V průběhu let došlo k modifikacím používaných technik a postupů, a to od způsobu odebírání vajíček, přes hormonální terapii, až po kryoprezervaci oplodněných embryí.

V 80. letech se díky rozvoji ultrasonografie začalo k získávání vajíček používat ultrazvukem řízené odebírání namísto laparoskopie. Výhodou byla přesnější vizualizace,

kontrolovatelnost, menší trauma pacientky a zkrácení doby výkonu z 1–2 h na 10–15 min (The ESHRE Working Group on Ultrasound in ART *et al.*, 2019; Wang *et Sauer*, 2006).

Mimo léčby ženské neplodnosti se do popředí zájmů začala dostávat také léčba mužské neplodnosti. První léčebná technika tzv. ‘partial zona dissection’ (PZD), při níž je částečně narušena *zona pellucida* pro usnadnění vstupu spermie do vajíčka, nebyla příliš úspěšná (Malter *et Cohen*, 1989). V roce 1991 byla poprvé použita metoda intra cytoplazmatické injekce spermie (ICSI) s úspěšností okolo 70 %, během které byly jednotlivé spermie získány z ejakulátu a mikro injikovány přímo do oocyty (Palermo, 1992). Tato metoda byla nadále modifikována a zdokonalována (např. perkutánní aspirace spermií) (Wang *et Sauer*, 2006).

Celý proces IVF se skládá z několika kroků (Obrázek 2): kontrolovaná hyperstimulace ovarii, odběr vajíček pod kontrolou transvaginálního ultrazvuku, inkubace vajíček se spermii, selekce embryí a jejich implantace do dělohy pacientky.



Obrázek 2: Hlavní technologie používané v asistované reprodukci: ICSI a IVF. Převzato a přeloženo z Ge *et Sun*, 2019.

Pro hyperstimulaci ovarii lze použít široké spektrum přípravků (GnRH analogy, přípravky s obsahem gonadotropinu nebo další adjuvantní léky), přičemž účinky jsou u každé ženy odlišné. Výběr je prováděn na základě anamnézy nebo klinických kritérií, z nichž nejdůležitější jsou výsledky předchozích IVF cyklů, pokud byly absolvovány. Po výběru protokolu je nutné zvolit správnou startovací dávku léčebné látky, jelikož množství folikulů se u pacientek liší, a tím pádem nelze nastavit fixní dávkování (La Marca *et Sunkara*, 2014), zároveň je také nutno předejít vzniku života ohrožujícího ‘ovarian hyperstimulation syndrome’ (OHSS) (Abbara *et al.*, 2018).

V okamžiku dosažení určitého vývojového stupně folikulů je zahájena finální maturace oocyty, a to pod vlivem lidského choriového gonadotropinu (hCG), GnRH agonistů nebo např. rekombinantního luteinizačního hormonu (LH), což vyvolá nástup ovulace mezi 38–40 hodinami po aplikaci. hCG je v posledních letech nahrazován GnRH agonisty a LH, aby bylo redukováno riziko vzniku OHSS (Abbara *et al.*, 2018; Humaidan *et al.*, 2011).

Transvaginální odběr oocytů (TVOR) je technika, pomocí které jsou odebírány zralé oocyty z vaječníků k následnému *in vitro* oplodnění. S využitím ultrazvukového navádění je jehla zavedena přes vaginální stěnu k folikulům, druhý konec jehly je napojen na sací zařízení. Odběr je proveden pro oba vaječníky a biologický materiál je dále zpracován v IVF laboratoři, kde dochází ke kvantifikaci odebraných vajíček. Zákrok je proveden při celkové anestezii, paracervikální blokací nebo spinální anestezii, lokální anestezie není v těchto případech používána (Jurema *et Nogueira*, 2006)

V laboratoři je provedena selekce vajíček (ve stádiu metafáze II. meiotického dělení) připravených pro fertilizaci (Jurema *et Nogueira*, 2006; “Stages of Embryo Development,” 2020) a jejich smíchání s předem ošetřeným vzorkem spermatu (popřípadě je provedena metoda ICSI) (Corona *et al.*, 2019; Van Steirteghem *et al.*, 1993). Aby byla redukována pravděpodobnost vícečetného těhotenství, lze použít techniku efektivního transferu jednoho embrya (eSET) v období blastocysty (5–6 dnů po oplodnění) namísto transferu v ‘cleavage stage’ (2–4 dny po oplodnění) (Dar *et al.*, 2014). Pro selekci kandidátních embryí lze využít klasické morfologicky zaměřené metody nebo metodu ‘time-lapse’ mikroskopie (TLM), přičemž TLM má lepší výsledky hlavně u starších pacientek (okolo 35 let) (Chen *et al.*, 2015). TLM umožňuje zachytit morfologické odchylky, které se klasickým statickým pozorováním dají zachytit velmi těžko. Mezi tyto odchylky patří nepravidelné dělení nebo kolaps blastocysty. Dalšími neinvazivními možnostmi selekce vhodného embrya jsou studia metabolických a proteomických profilů. Lze provést i invazivní zákrok biopsie, hlavně pro genetické a chromozomální testování (Zaninovic *et al.*, 2017).

Implantace embrya závisí na správně vyvíjejícím se embryu stejně tak, jako na interakcích mezi blastocystou a endometriem. Lze ji provést jen v časově omezeném intervalu receptivní fáze, tzv. ‘window of implantation’ (WOI) charakterizovaném dynamickými genotypovými a fenotypovými změnami buněk sliznice. Za úspěšnou se implantace považuje ve chvíli, kdy je ultrazvukem zachycen tzv. gestační vak. Naopak jako selhání implantace se označují situace, kdy neexistuje důkaz implantace v podobě produkce hCG, nebo došlo-li k produkci

hCG, nikoliv však k formaci gestačního vaku. Příčin selhání je mnoho, může se jednat o abnormality dělohy, hormonální nebo metabolickou nerovnováhu, infekce, trombofilie, a také celkový fyzický a psychický stav pacientky (Timeva *et al.*, 2014).

3.3 Děloha

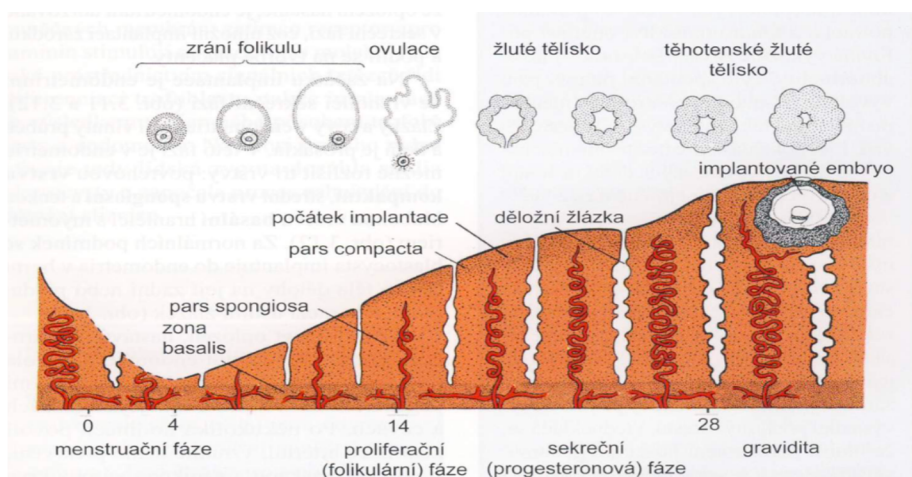
Děloha je dutý ženský orgán hruškovitého tvaru s délkou okolo 7,5 cm a skládá se z několika částí: fundus, tělo a děložní čípek. Dále pak z vejcovodů, přičemž každý vstupuje do superolaterálního cornu, nad kterým je položen fundus. Tělo dělohy se zužuje do tzv. šíje a pokračuje jako děložní čípek (cervix). Ten je okolo své střední části ohraničen pochvou, a podle tohoto uchopení definujeme vaginální a supravaginální část děložního čípku. Čípek se v průběhu života ženy mění, u negravidních žen má svrchní strukturu podobnou špičce nosu a v období gravidity se strukturně podobá spíše povrchu rtů.

Spojení 1,5 mm dlouhé šíje s tělem v dutině dělohy je označováno jako tzv. vnitřní os a samotná šíje se v těhotenství stává spodním segmentem dělohy. Děložní dutina komunikuje s cervikálním kanálem prostřednictvím vnitřního os a kanál se následně otevírá do prostoru pochvy (Ellis, 2011).

3.3.1 Endometrium

Stěna dělohy je utvářena třemi vrstvami: endometriem (sliznice), myometriem (svalovina) a perimetriem (serosní vrstva) (Číhák, 2013a).

Hlavním biologickým úkolem děložní sliznice je zajištění úspěšného vzniku těhotenství (Timeva *et al.*, 2014). Endometrium je tvořeno komplexním mnohobuněčným epitelem a vazivem sliznice a pevně srůstá s děložní svalovinou. Přibližně každých 28 dní prodělává povrchová vrstva sliznice změny v rámci menstruačního cyklu (Obrázek 3), jejichž výsledkem je uvolnění této vrstvy společně s krvácením. Každý cyklus je tvořen ze tří fází: proliferační, sekreční a menstruační fáze (Číhák, 2013a; Sadler, 2011). Cyklické změny jsou kontrolovány hladinami steroidních hormonů (estrogeny, progesteron, androgeny a glukokortikoidy) a zahrnují změnu struktury buněk, expresi specifických molekul buněčného povrchu společně se sekrecí cytokinů, chemokinů a růstových faktorů a fází regenerace (Timeva *et al.*, 2014).



Obrázek 3: Děložní sliznice v průběhu ovariálního cyklu. Převzato ze Sadler, 2011.

Sekreční epitel, který pokrývá horní část děložního čípku zvanou endocervix, produkuje cervikální hlen. Mucinózní epitel se vmezežuje mezi cervikální stroma a tvoří tak endocervikální žlázy, které následně vylučují viskózní tekutinu bohatou na glykoproteiny. Jedná se o hydrogel, který je tvořen z 90–95 % vodou a mucinovými glykoproteiny (například MUC1 nebo MUC4) (Kurita, 2018; Timeva *et al.*, 2014). Muciny jsou nejvíce abundantní proteiny v období ovulace a jejich koncentrace jsou závislé na hormonálních změnách. Podílejí se na přeměně fibrózní pre-ovulační struktury na globulární ovulační strukturu hleny. Abundance ostatních proteinů se zvyšuje v období luteální fáze (Grande *et al.*, 2015).

3.3.2 Cervikální hlen

V průběhu menstruačního cyklu dochází také k cyklickým změnám cervikálního hleny, závislým na kolísání estrogenu a progesteronu. Před ovulací je hlen více fluidní a řidší, následně je jeho struktura kompaktnější (Václavková *et al.*, 2020). Tyto změny jsou hlavními faktory, které ovlivňují schopnost spermií jím proniknout a oplodnit vajíčko. Zároveň představuje důležitou bariéru, která zabraňuje vstupu patogenů do ženského genitálního ústrojí (Han *et al.*, 2017). Cyklické proměny struktury hleny mají zásadní, i když doposud málo prozkoumaný dopad na plodnost a reprodukční zdraví (Shi *et al.*, 2021). Představuje v praxi důležitý diagnostický marker nastupující ovulační fáze, čehož je využíváno v mnoha kulturách pro rozpoznání plodných dnů, a tím pádem plánování početí (Grande *et al.*, 2015).

Díky neustálému rozvoji proteomických technologií a metod je možné se stále více soustředit na identifikaci potenciálních diagnostických, prognostických i terapeutických markerů v biologických tekutinách (Timeva *et al.*, 2014). I přes to, že je cervikální hlen

do této skupiny řazen, neexistuje proteomický panel, který by jej charakterizoval. Mezi nejvíce zastoupené patří plazmatické proteiny, jelikož jsou odpovědné za metabolické reakce, imunitní odpovědi a buněčný transport (Panicker *et al.*, 2010).

Cervikální hlen poskytuje cenné informace i při diagnostice endometriózy. Jedná se o chronické zánětlivé gynekologické onemocnění, které postihuje 7–10 % žen v reprodukčním věku a až 50 % žen trpících tímto onemocněním jsou diagnostikovány jako neplodné. V případě endometriózy bylo identifikováno 6 proteinů (příčemž 4 jsou spojovány s pro-zánětlivostí) ve zvýšené hladině a 9 proteinů (především mediátory zánětlivých reakcí) ve snížené hladině oproti zdravým pacientkám. 15 proteinů, které za fyziologických podmínek zodpovídají za antimikrobiální aktivitu, nebylo u nemocných pacientek přítomno vůbec (Grande *et al.*, 2017a). Jedním z kandidátních proteinů, který vzniká zvýšenou expresí u endometriózy, je Apolipoprotein A-I. Je tedy možné, že změny v jeho sekreci by mohly představovat faktor v patogenezi endometriózy, a tím pádem i ovlivňovat implantaci embrya (Brosens *et al.*, 2010).

V roce 2013 byla pod vedením Sonali R. Bhagwata, vytvořena ‘Human Gene Expression Endometrial Receptivity database’, která zahrnovala 19 285 genů (Bhagwat *et al.*, 2013).

S vývojem ‘high-throughput’ technologií, jako je proteomika, je ale možné onemocnění včas identifikovat porovnáním proteinového složení vzorku abnormální a zdravé tkáně (Grande *et al.*, 2017a).

3.4 Proteomika

Dle centrálního dogmatu molekulární biologie jsou proteiny konečným produktem genové exprese a pravděpodobně nejlépe reflektují fenotyp a funkční stav organismu (Aebersold *et al.*, 2018; Mann *et al.*, 2021). Kontrolují a katalyzují všechny buněčné procesy a společně tvoří vysoce strukturovanou entitu tzv. proteom. Mohou ale také odpovídat za vznik různých onemocnění (Alzheimerova nebo Huntingtonova choroba) nebo naopak fungují jako terapeutika (protilátky proti bakteriálním nebo virovým infekcím) (Timp *et Timp*, 2020).

I když se už v 50. letech 20. století vědci začali zabývat studiem aminokyselinových sekvencí proteinů (Edman, 1949; Sanger *et Tuppy*, 1951), tak sekvenování RNA a DNA výrazně převládlo. Do 90. let 20. století bylo sekvenování proteinů prováděno hlavně Edmanovou degradací, takto je možné osekvenovat až 30 aminokyselin, ovšem metoda je závislá na N-terminální skupině, a pokud je tato skupina jakkoli modifikována, nebude

reakce fungovat. Zároveň není možné metodu použít pro lokalizaci disulfidových vazeb (Edman, 1949).

Pro studium proteomu bylo obecně možné použít dva přístupy. První strategie pracovala s již zavedenými metodami, kdy byly izolovány proteiny a poté probíhala jejich analýza s ohledem na strukturu a funkci. Druhou možností bylo provedení rozsáhlých systematických měření a analýza získaných datových souborů. Oba přístupy byly výrazně ovlivněny nástupem metod hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry; MS), jelikož ty poskytují možnost identifikovat a kvantifikovat jakýkoli protein, který byl exprimován, nebo identifikovat a lokalizovat modifikované aminokyseliny v polypeptidovém řetězci (Aebersold *et Mann*, 2016).

V dnešní době jsou proteomické analýzy zaměřeny především na ‘bottom-up‘ přístup spojený s MS. Postup zahrnuje enzymatické štěpení proteinů, následně ionizaci získaných peptidů a jejich separaci podle poměru hmoty a náboje (m/z) a jejich detekci. Ionizace peptidů pro další analýzu může být provedena: ionizací elektrosprejem (ESI) nebo laserovou desorpcí s účastí matrice (MALDI). Popřípadě je možné provést kapalinovou chromatografii ve spojení s MS (LC-MS) pro separaci komponent vzorku ještě před ionizací a vstupem do analyzátoru (Goeminne *et al.*, 2018; Timp *et Timp*, 2020). Kapalinová chromatografie slouží nejen k separaci vzorku, ale také k jeho zakoncentrování, a dále poskytuje spektrometru více času pro analýzu, jelikož základní peptidy jsou eluovány v různých časech (Kertesz-Farkas *et al.*, 2012). Největší výzvu představuje nutnost převést heterogenní data do smysluplného obsahu a sbírat meta-data pro evaluaci výsledků (Häkkinen *et Levander*, 2011).

3.5 Hmotnostní spektrometrie

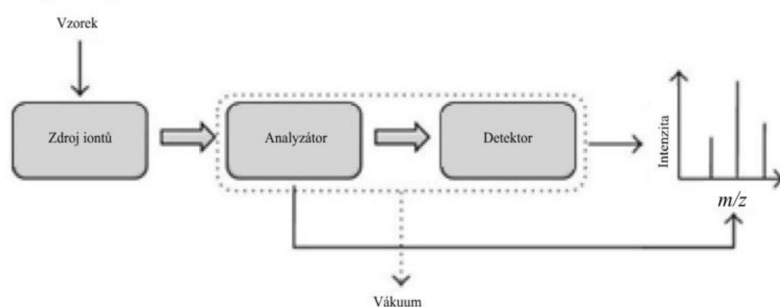
Od svého vzniku na počátku 20. století prochází hmotnostní spektrometrie neustálým vývojem a v dnešní době dosahuje vysokých detekčních limitů. Dokáže tak zachytit přítomnost a množství peptidů nebo jiných biomolekul s využitím jejich základních vlastností, jako jsou hmotnost a náboj (Sinha *et Mann*, 2020).

V případě proteomiky založené na hmotnostní spektrometrii je důraz kladen na komplexní a rozsáhlá měření změn v úrovních genové exprese, buněčné lokalizace, interakcí a post-translačních modifikací. Takové změny nelze primárně zjistit z DNA nebo RNA sekvence, jelikož proteom je výrazně složitější, protože z jednoho genu mohou být potenciálně vytvořeny stovky i tisíce možných proteinů (tzv. proteoformy).

Díky této variabilitě a složitosti je proteomika méně obvyklou disciplínou než postupy založené na sekvenování nové generace (NGS). Nicméně, v průběhu let docházelo, a stále dochází, ke zlepšování proteomických analýz. Také byla vyvinuta celá řada specializovaných metod, a je tedy možné posuzovat stav celého organismu (Mann *et al.*, 2021).

Hlavní předností je vysoká specifita a citlivost při identifikaci proteinů, a to až na úroveň samotných iontů (Aebersold *et Mann*, 2016). Za nevýhodu MS ve spojení s ‘bottom-up‘ proteomikou se považuje nutnost štěpení proteinů na peptidy o délce 5–20 aminokyselin relativně dlouho před samotnou analýzou a identifikací, a také vyhledávání v databázích, které je závislé na srovnávání krátkých peptidů s celými proteiny podle sekvenční homologie nebo podle podobnosti, kterou s proteiny sdílejí. Konečného přiřazení je nakonec dosaženo buď inkluzí peptidu se všemi pravděpodobně příbuznými proteiny, dále exkluzí, při níž jsou všechny sdílené peptidy před rekonstrukcí odstraněny, nebo parsimonií, vyhledávající minimální sestavu proteinů, které dokážou vysvětlit předmět pozorování. Výsledky jsou následně seřazeny podle hodnoty přiřazených skóre (Timp *et Timp*, 2020).

Hmotnostní spektrometr má tři hlavní části: zdroj iontů, analyzátor a detektor (Obrázek 4). Analyzovány mohou být pouze ionty v plynné fázi, a proto musely být vyvinuty techniky jako ESI nebo MALDI. Při ESI je kapalina obsahující peptidy tlačena otvorem o velikosti několika málo mikrometrů s vysokým napětím (2–4 kV), na jehož konci proud kapaliny rozpadá na malé, vysoce nabitě a rychle se odpařující kapky, čímž jsou peptidové ionty převedeny do plynné fáze. Běžným krokem je separace peptidové směsi pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Sinha *et Mann*, 2020a), která redukuje komplexitu vzorku, a tím umožňuje větší hloubku pokrytí proteomu (Pino *et al.*, 2020; Zubarev *et Makarov*, 2013).



Obrázek 4: Základní komponenty hmotnostního spektrometru. Převzato z Banerjee *et Mazumdar*, 2012.

Výsledkem LC-MS/MS analýzy jsou fragmentační hmotnostní spektra iontů, a ty lze dále využít při: *De novo* sekvenování, ‘sequence-tagging’ nebo nejčastěji pro porovnání surových neinterpretovaných dat s teoretickými daty v databázích (Kertesz-Farkas *et al.*, 2012).

Hmotnostní spektrometry mají více možných variant při volbě způsobu ionizace, analýzy spekter a metod detekce. Ionizační metody jsou důležité pro určování látek ve vzorku dostupných pro měření, ale kvalitu a spolehlivost analýzy určuje kombinace hmotnostního analyzátoru a detektoru. V závislosti na fyzikálních vlastnostech rozlišujeme kvadrupólové analyzátory, iontové pasti, ‘time-of-flight’ (TOF), orbitrap nebo také generické typy Fourierovy transformace (FT).

3.5.1 Kvadrupól

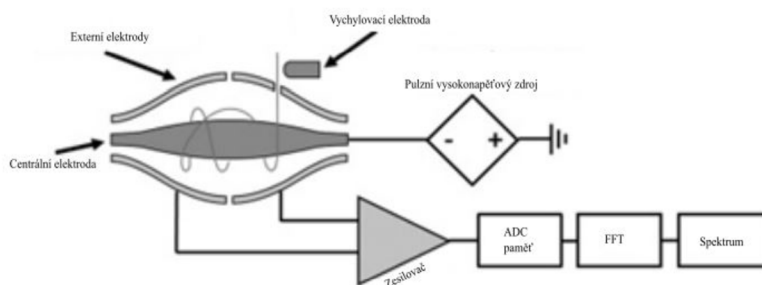
Hmotnostní analyzátory typu kvadrupólu, někdy také označovány jako tzv. hmotnostní filtry, jsou schopny selekce iontů o určité m/z hodnotě. Jedná se o nejpoužívanější typy spektrometrů v klinické praxi, i přes to, že z hlediska citlivosti, rozlišení a hmotnostního rozsahu jsou kvadrupóly horší než stroje s magnetickým sektorem. Jejich výhoda ale spočívá ve snadném použití, cenové dostupnosti, velikosti a snadném propojení s plynovou chromatografií (GC) či LC systémy.

Analyzátory jsou složeny ze čtyř paralelních železných tyčí (elektrod) umístěných ve stejné vzdálenosti od středové osy. Elektrody jsou nabíjeny stejnosměrným proudem, přičemž opačné páry tyčí mají náboje podobné. Každý pár protilehlých tyčí je elektricky propojen a je mezi nimi přiváděno střídavé napětí. K samotné stabilizaci/destabilizaci iontů slouží oscilující elektrické pole (Thomas, 2019).

3.5.2 Orbitrap

V roce 2005 se do popředí zájmu vědecké společnosti dostal analyzátor Orbitrap, který byl vyvinut Alexandrem Makarovem v roce 1996. Jedná se o přesný a kompaktní přístroj, který umožňuje obejít hlavní omezení jeho předchůdců (Makarov, 2000; Zubarev *et Makarov*, 2013).

Orbitrap (Obrázek 5) využívá statické elektrické pole na rozdíl od kvadrupólu, který je založen na použití dynamického elektrického pole s typickou oscilací okolo 1 MHz. Po injekci vzorku do přístroje dochází k tvorbě iontů pomocí ESI, které jsou posouvány přes transportní kvadrupóly do lineární iontové pasti nebo ‘storage’ kvadrupólu.



Obrázek 5: Schéma analyzátoru typu Orbitrap. Převzato a přeloženo z Briois *et al.*, 2016.

Nad koncem tohoto kvadrupólu je umístěný kroužek, který vytváří slabý axiální potenciál uvnitř kvadrupólu. Ionty jsou následně zpomalovány a seskupovány v axiální jamce o malém rozměru (řády mm) a jakmile je nashromážděn dostatek iontů (obvykle za 10–400 ms), dochází k vytvoření pulzu, který otevře zadní čočku kvadrupólu. Tímto se vytvoří silné elektrické pole podél osy kvadrupólu, což vede k rychlé extrakci shromážděných iontů, které jsou v krátkém čase (100–200 ns) transportovány ke vstupu do Orbitrapu. Ionty jsou před transportem do vstupního kanálu urychlovány pomocí systému iontových optických čoček. Vstřikování iontů do analyzátoru Orbitrapu je uskutečňováno přepínáním napětí na určité hodnoty, které je přiváděno na čočku umístěnou na obvodu Orbitrapu (Hu *et al.*, 2005).

Obecně se využívají dvě strategie akvizice dat definované způsobem snímání prekursorových iontů a fragmentovaných iontů. Nevyžaduje-li přístup žádné předchozí znalosti o proteinech ve vzorku, je označován ‘discovery’ nebo ‘shotgun’ proteomika, řídí-li se dle předem formulované hypotézy, je označován jako cílená proteomika.

3.5.3 Label-free metody

Label-free metody, při kterých se nepoužívají izotopové značky, zahrnují čtyři základní kroky. Prvním je příprava vzorku, která zahrnuje extrakci, redukci, alkylaci a digesci. Následuje separace a analýza vzorku s pomocí LC-MS/MS, analýza dat, a nakonec jejich interpretace (Wang *et al.*, 2008).

Nespornou výhodou label-free metod je praktická nepřítomnost horní hranice, co se týče počtu vzorků, které lze mezi sebou srovnávat, a také možnost obejít drahé a náročné procesy značení vzorků. Kromě toho je možné identifikovat až o 60 % více proteinů, jelikož hmotnostní spektrometr nemusí fragmentovat každou značenou formu téhož peptidu.

Za nevýhodu tohoto přístupu je považována skutečnost, že peptid, který je vybrán pro fragmentaci v jednom běhu, nemusí být v dalším běhu znova vybrán, nebo může zhoršovat kvalitu výsledného hmotnostního spektra jiného běhu, což vede ke ztrátám dat.

Při analýze dat je prvním důležitým krokem samotná identifikace proteinu, ale vzhledem k technologickému pokroku není možné data hodnotit manuálně (dnes jsou přístroje schopny identifikovat až okolo 25 000 peptidů z MS² spektra v závislosti na nastavení přístroje a kvalitě vzorku), a proto byla potřeba vyvinout účinné nástroje bioinformatiky s vysokou kapacitou (Goeminne *et al.*, 2018).

3.6 Bioinformatická analýza dat

S neustále se zvyšujícími nároky na kvalitu přístrojů, přesnost a kvalitu zpracovávaných dat, nejen v proteomice, ale napříč vědními obory, bylo potřeba začít se zabývat vývojem bioinformatických nástrojů, které procesy automatizují a výrazně urychlí (Keller *et al.*, 2002). I přes to, že bylo vyvinuto už mnoho analytických nástrojů a funkcí, musí být vyřešeny ještě další zbývající výzvy: detailní anotace nebo tvorba validovaných pracovních postupů z dostupných nástrojů s jejich následnou implementací.

Největší problém představuje reprodukovatelnost. Pokud je analýza závislá na jednom softwaru, tak je tím pádem závislá i na jeho dostupnosti a vývoji. S přechodem na jiný software by byly téměř určitě generovány jiné výsledky (Palmblad *et al.*, 2019).

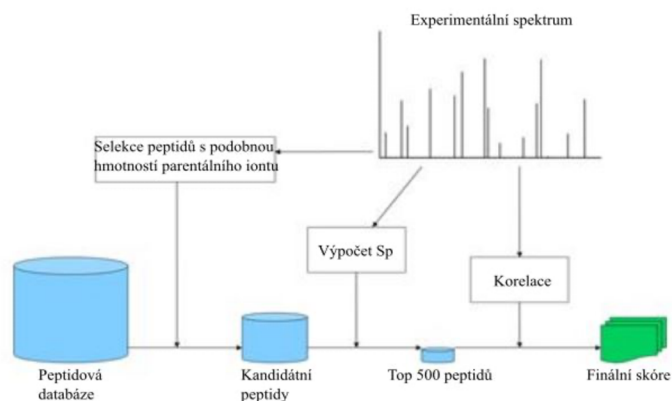
3.6.1 Databáze

Vyhledávání na základě MS/MS spekter lze charakterizovat jako rozpoznávání a porovnávání experimentálních dat s daty v databázi, přičemž jsou hledána ta data, která si nejvíce odpovídají v rámci zadaných parametrů.

Většina algoritmů přitom sdílí několik společných rysů. Kritická je například reprezentace a míra podobnosti dat, nicméně formáty používané pro ukládání dat a formáty pro prohledávání v databázích jsou odlišné (Kertesz-Farkas *et al.*, 2012).

3.6.2 Vyhledávací algoritmy

SEQUEST algoritmus pracuje na principu vzájemné korelace. Korelační funkce generuje skóre na základě porovnání získaného experimentálního spektra s teoretickým spektrem uloženým v databázi. Informace experimentálního spektra jsou nezbytné hned ve třech krocích. Zprv jako filtr pro selekci peptidů z databáze, které sdílí podobnou hmotnost původního iontu s neznámým peptidem, zadruhé během předběžného filtru ‘closeness-of-fit’ pro výběr 500 kandidátních peptidů a zatřetí v rámci korelace pro vytvoření finálního skóre (Obrázek 6) (McHugh *et al.*, 2008). Každému spektru je tedy přiřazen peptid z databáze s nejvyšším celkovým skóre (Keller *et al.*, 2002).



Obrázek 6: Zjednodušený vývojový diagram SEQUEST algoritmu popisující proces, kterým jsou poskytována skóre pro identifikaci peptidů. Převzato a přeloženo z McHugh *et al.*, 2008.

Program Mascot používá pro identifikaci proteinů pravděpodobnostní skórovací algoritmus, který byl upraven z algoritmu MOWSE. Program Andromeda je široce používaný nástroj pro vyhledávání peptidů založený na pravděpodobnostním skórování. Podobně jako Mascot umožňuje zpracování dat s libovolnou hmotností fragmentů, dokáže přiřadit a skórovat komplexní vzory PTM a zvládá pojmout velmi rozsáhlé databáze. Program lze používat samostatně, nebo v rámci programu MaxQuant, načež toto spojení umožňuje analýzu velkých datových souborů (Cox *et al.*, 2011).

3.6.3 Programy pro zpracování dat

Výrobci hmotnostních spektrometrů ke svým produktům často poskytují vlastní software, přičemž profesionální programy nabízí možnosti, kterými freewarové verze většinou nedisponují (uživatelská podpora, návody pro manipulaci s programem, intuitivní vzhled a aktualizace platformy).

Příkladem je program Proteome Discoverer firmy Thermo Fisher Scientific, který umožňuje statistické zpracování velkých datových souborů. Disponuje nástroji pro interpretaci dat, což usnadňuje identifikaci a kvantifikaci proteinů v komplexních biologických vzorcích.

Program umožňuje provádět proteinové a peptidové identifikace, analýzu post-translačních modifikací (PTM) nebo izobarického značení (př. iTRAQ) a label-free kvantifikace. Je podporováno mnoho algoritmů pro práci s databázemi (SEQUESTTM, Mascot nebo MS Amanda), tyto křížové kombinace navíc zvyšují validitu výsledků (“Proteome Discoverer Software - CZ,” 2020). Přesnější predikce fragmentačních hmotnostních spekter je zabezpečena neuronovou sítí ProSIT, která je licencována ve spolupráci s MSAID GmbH (“New Thermo Scientific Proteome Discoverer 2.5 software strengthens laboratory workflows,” 2020).

Dalšími programy jsou: ProteinScape™ firmy Bruker, ProteinPilot™ firmy AB SCIEX nebo The MassHunter™ firmy Agilent. ProteinPilot™ kombinuje algoritmy s intuitivním uživatelským rozhraním, umožňuje proteinovou identifikaci a vyhledávání velkých počtů PTM bez nárůstu časového vytížení a falešné positivity (Seymour *et* Hunter, 2018). Program ProteinScape™ využívá algoritmus Mascot společně s algoritmy pro vyšší spolehlivost a kvalitu výsledných identifikací. Součástí programu jsou možné PTM, teoretická fragmentační spektra nebo rekalibrační nástroje. Po úspěšné identifikaci proteinu program automaticky přiřazuje informace o taxonomii nebo strukturálních vlastnostech z externích databází (“ProteinScape - Bruker Daltonics Inc. Technical Documentation,” 2015).

Velmi používaným volně dostupným programem pro kvantitativní proteomiku je MaxQuant využívající funkci ‘match between runs’. Je schopen přiřadit m/z prekurzorového iontu a retenční čas píku mezi jednotlivými běhy vzorků, a může tak odvodit identitu peptidu z běhu s MS2 identifikací. Program Skyline disponuje uživatelským rozhraním, které zjednodušuje vývoj MS metod a analýzu dat z cílených proteomických experimentů prováděných pomocí ‘selected reaction monitoring’ (SRM). Umožňuje tvorbu MS/MS knihoven díky široké nabídce zdrojů SRM filtrů a ověřování výsledků na základně již dříve získaných dat. Je možné importovat soubory z přístrojů firem Agilent, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific a Waters (MacLean *et al.*, 2010).

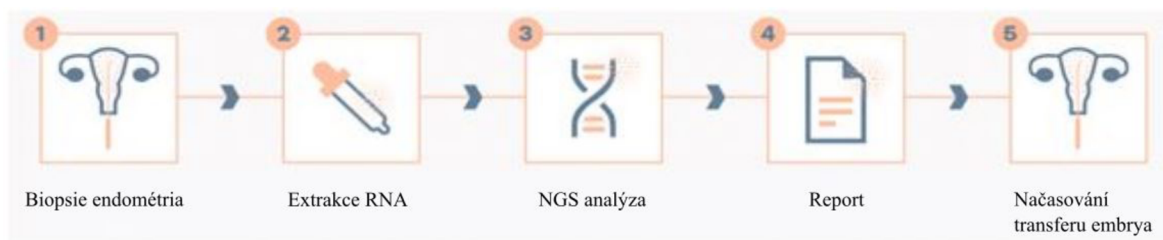
3.7 Diagnostika v oblasti léčby neplodnosti

Mnoho vědeckých týmů se zabývá identifikací biomarkerů pro stanovení vhodné doby implantace embrya. Markery receptivity endometria lze stanovovat více způsoby, ultrazvukovým vyšetřením, biopsií, hysterektomií nebo aspirací endometriální tekutiny. Přestože byly nalezeny asociace mezi těhotenstvím, tloušťkou a vzorem endometria nebo přítomnými molekulami, nízká schopnost predikce úspěšného těhotenství neumožňuje jejich plošné používání v klinické praxi (Craciunas *et al.*, 2019).

3.7.1 Diagnostika receptivity endometria

‘Endometrial receptivity analysis’ (ERA) test hodnotí profil genové exprese s cílem identifikovat specifický transkriptomický profil, díky kterému by bylo možno přesněji načasovat transfer embrya. Provádí se invazivní biopsie endometria v období WOI, následná extrakce RNA, NGS analýza a hodnocení (Obrázek 7).

Vzorky jsou děleny na receptivní, nereceptivní, pre-receptivní a post-receptivní pomocí statistických metod (Craciunas *et al.*, 2019), s hlavním záměrem zamražení embryí pro přenos v době, kdy je tělo nejlépe připraveno. I když byl test komerčně nabízen jako úspěšný nástroj pro zvýšení přesnosti a úspěšnosti implantace, existuje mnoho otázek, které doposud nebyly zodpovězeny.



Obrázek 7: Diagnostika pomocí ERA testu. Převzato a přeloženo z Endometrial Receptivity Analysis Test | Igenomix, 2021.

Protože jsou arraye v dnešní době z velké části nahrazeny sekvenováním druhé generace (NGS), a není jasné kolik genů by mělo být testováno, mnoho vědeckých skupin používajících arraye identifikovalo různý počet genů, které jsou během WOI up-regulovány nebo down-regulovány. Navíc pro implantaci embrya je nezbytný jeho kontakt s endometriem, nicméně biopsie je provedena ještě před tímto kontaktem, což představuje další limitaci. Bez standardní metody, se kterou by bylo možné výsledky porovnávat, nelze bezpečně určit, zda může použití ERA testu významně zvýšit míru úspěšnosti implantace (Ben Rafael, 2021).

‘Endometrial microbiome metagenomic analysis’ (EMMA) hodnotí endometriální flóru z hlediska kvantifikace všech přítomných bakterií. Součástí EMMA testu je i ‘Analysis of infectious chronic endometriosis’ (ALICE) test, který identifikuje patogenní bakterie podílející se na vzniku chronické endometriózy.

Test poskytuje informaci, zda je mikrobiální složení vnitřního prostředí vhodné pro implantaci embrya, hodnotí množství zdravých prospěšných bakterií, ale i nejčastějších patogenních bakterií (Moreno *et al.*, 2018, 2016).

3.7.2 Diagnostické metody pro vyšetření spermií a ženského pohlavního ústrojí

Ve 40–50 % případů je neplodnost na straně muže. Příčinami jsou: nízký počet spermií, poruchy aktivity, motility nebo morfologie spermií, což lze zjistit provedením laboratorních testů (Kumar *et Singh*, 2015). Mohou být provedeny i další lékařské výkony, jako ultrazvuk varlat, trans-rektální ultrazvuk, hormonální testy, post-ejakulační urianalýza, genetické testy

nebo biopsie tkáně varlat (“Diagnostic evaluation of the infertile male,” 2015). Ultrazvukové vyšetření jsou rychlé, relativně levné a zdraví neohrožující zákroky, sloužící jako podpůrné informace doplňující celkový stav pacienta (Morgan *et Bell*, 2015).

U žen jsou nejprve provedeny krevní testy a je stanovena hladina hormonů (př. progesteron). Tyto testy jsou prováděny na základě pravidelnosti menstruačního cyklu. Mohou být provedeny i testy na sexuálně přenosné choroby (chlamydie mohou negativně ovlivnit plodnost ženy).

Velmi používanou metodou je ultrazvukové vyšetření zaměřující se na kontrolu vaječníků, dělohy a vejcovodů. Onemocnění postihující dělohu, jako jsou endometrióza či fibróza, mohou mít výrazný negativní efekt na úspěšnost početí, zároveň je vyšetření schopno odhalit možné srůsty nebo blokace průchodnosti vejcovodů. Invazivnější metodu představuje laparoskopické vyšetření, kdy je do těla pacientky malým řezem zaveden laparoskop zakončený kamerou (Cena *et al.*, 2020; “Diagnosis of infertility” 2017). V případě potřeby může lékař provést i biopsii endometria (Hoffman, 2021.).

3.7.3 Studie panelu biomarkerů přítomných v cervikálním hlenu

Biomarkery jsou uplatňovány při klasifikaci, screeningu a predikci, měření toxických nebo preventivních expozičních nebo jako diagnostická pomůcka pro individualizovaný postup léčby. Diagnostický marker je využíván u pacienta vykazujícího určité symptomy, screening je uplatňován v případě, kdy žádné symptomy neexistují (v počátečních stádiích nemoci) a u pacientů s onemocněním slouží prognostické markery k predikci opakování nebo progresu nemoci.

Proces studia biomarkeru má několik fází, je nutno marker identifikovat, poté následuje série evaluačních klasifikačních kroků a na konec je hodnocen vliv biomarkeru na klinický stav pacienta, přičemž každým krokem může být popsán několika samostatnými studiemi (Pepe *et al.*, 2008).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- Vzorky cervikálního hlenu odebrané v rámci studie BIOMER.
- Všechny vzorky byly odebrány na základě informovaného souhlasu pacientek.

4.2 Přístroje a zařízení

- Analytické váhy SBC21 (Scaltec)
- Centrifuga ROTINA 420R (Hettich)
- Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf)
- Eppendorf MiniSpin (Eppendorf)
- Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Magnetická míchačka s ohřevem MSH 300 (Biosan)
- MS Vortex Incubator (Major Science)
- pH metr inoLab 7110 (WTW)
- Sonopuls (Bandelin)
- Spektrofotometr EnSpire® (PerkinElmer)
- Sunflower Mini-Skaker (Biosan)
- Třepačka Reax control (Heidolph)
- Vodní vyhřívání lázeň SUB Aqua 12 Plus (Grant)
- Vyhřívání termostat Bio TDB-100 (Biosan)
- Zásobník deionizované vody Milli-Q (Millipore)

4.3 Software

- EnSpire Manager, verze 4.10.3005.1440
- Microsoft® Excel®, verze 16.0.11929.20436
- Proteome Discoverer 2.4. 0. 305
- MaxQuant 1.6.2.10
- Perseus 1. 6. 2. 2

4.4 Chemikálie

- Aceton (Sigma-Aldrich, kat. č. 650501)
- Acetonitril (Merck Millipore, kat. č. 100029)

- Dithiothreitol (Roche, kat. č. 56166122)
- Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. 71729)
- Hydrogenuhlíčan amonný (Fluka; Sigma-Aldrich, kat. č. 09830)
- Jodacetamid (Sigma-Aldrich, kat. č. I1149)
- Kyselina octová (Fluka; Sigma-Aldrich, kat. č. 49199)
- Kyselina chlorovodíková (mikroCHEM[®], kat. č. 10172LP20)
- Kyselina trifluorooctová (Fluka; Sigma-Aldrich, kat. č. 14264)
- Methanol (Sigma-Aldrich, kat. č. 1.06035)
- Močovina (Sigma-Aldrich, kat. č. U5378)
- MS voda (Merck Millipore)
- Pierce[™] kyselina trifluorooctová (Thermo Scientific[™], kat. č. 85183)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Roche, kat. č. 10708976001)
- Trypsin/LysC Mix (Promega, kat. č. V5073)

4.5 Soupravy

- Pre-Diluted Protein Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set (Thermo Scientific[™], kat. č. 23208)
- Pierce[®] 660 nm Assay
 - Pierce[®] 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Scientific[™], kat. č. 22660)
 - Ionic Detergent Compatibility Reagent (Thermo Scientific[™], kat. č. 22663)
- Pierce[™] BCA Protein Assay
 - Pierce[™] BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Scientific[™], kat. č. 23223)
 - Pierce[™] BCA Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific[™], kat. č. 23224)

4.6 Roztoky

- FASP lyzační pufr (4% SDS, 0,1 mol·l⁻¹ dithiothreitol v 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,6)
- 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,6 a pH 8,5)
- 0,05 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8,5
- UA (8 mol·l⁻¹ močovina v 0,1 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8,5)
- IAA (0,05 mol·l⁻¹ jodacetamid v UA)

4.7 Použité experimentální a vyhodnocující postupy

4.7.1 Příprava vzorků

Vzorky cervikálního hlenu byly rozmrazeny na ledu a byly krátce zcentrifugovány. Dle návodu byl připraven FASP lyzační pufr, který byl ke každému vzorku přidán v množství 500 μl a následně byla provedena sonikace ultrazvukovou jehlou Sonopuls (amplituda: 65 %, čas: 1 min, puls: 1 s, pauza: 1 s).

Dále bylo připraveno činidlo pro kompatibilitu s ionogenními detergenty (Metoda Pierce 660 nm). Do 96 jamkové destičky byly napipetovány standardy BSA (125–2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), jako blank byla použita deionizovaná voda a FASP lyzační pufr. Standardy, vzorky, blank i voda byly napipetovány v duplikátech v objemu 10 μl . Připravené činidlo bylo přidáno do odpovídajících jamek v objemu 150 μl . Destička byla míchána 1 min, inkubována 5 min při pokojové teplotě a byla změřena absorbance. Byla vytvořena kalibrační křivka (v programu Excel) a pomocí rovnice lineární regrese byly vypočítány neznámé koncentrace vzorků, ze kterých byl vypočítán objem s obsahem 100 μg proteinu pro následné štěpení. U vzorků o nízkých koncentracích bylo vypočítáno množství proteinu ve 400 μl . Podle těchto výsledků byly vzorky přepipetovány do nových označených zkumavek a 10 min inkubovány při 95 °C.

4.7.2 Štěpení proteinů na membráně (FASP)

Štěpení bylo provedeno dle námi modifikovaného návodu (Wiśniewski, 2016). Na filtry s membránami Millipore Microcon 30 bylo nanášeno 100 μg proteinu, ovšem u vzorků o nízké koncentraci bylo nanášeno 400 μl původního vzorku. Bylo přidáno 200 μl roztoku UA a membrány byly centrifugovány při 12 500 g 15 min, namísto uváděných 10 000 g. Následovalo přidání 100 μl UA a centrifugace. Obsah, který filtry protekl byl odstraněn a bylo přidáno 50 μl IAA, vzorky byly 20 min inkubovány ve tmě. Po uplynutí inkubace byly filtry promyty: 2x 100 μl UA a 2x 100 μl 0,05 0,05 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl pH 8,5. Enzymatické štěpení bylo provedeno použitím Trypsin/LysC Mix přes noc.

Koncentrace peptidů po digesci byla zjištěna pomocí BCA metody. Do 96 jamkové destičky byly v duplikátech napipetovány standardy (125–2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), blank (MS-H₂O a 0,05 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl pH 8,5) a vzorky v objemu 10 μl . BCA činidlo bylo připraveno dle návodu výrobce a bylo přidáno do všech obsazených jamek v objemu 200 μl , destička byla 30 min inkubována při 37 °C. Byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru, v programu Excel byla vytvořena kalibrační křivka a byly vypočítány koncentrace peptidů

v jednotlivých vzorcích. Posléze byl vypočítán objem vzorků s obsahem 10 µg peptidů, který byl přenesen do nových označených zkumavek (u dvou vzorků bylo na C18 kolonu naneseno poloviční množství, 5 µg peptidů, z důvodu nižší koncentrace). U pěti vzorků byly koncentrace příliš nízké, a proto byly vyřazeny.

4.7.3 Precipitace detergentů

Z důvodu možné kontaminace vzorků detergenty bylo provedeno srážení ledově vychlazeným acetonem. Ke vzorkům byl přidán 1 ml ledového acetonu, vzorky byly 20 s protřepávány a 10 min inkubovány. Po uplynutí inkubační doby byly vzorky centrifugovány 10 min při 10 000 g. Supernatant byl odstraněn, ale zkumavky byly ponechány 30 min otevřené, aby došlo k úplnému odpaření acetonu.

4.7.4 Purifikace peptidů

Pro přečištění vzorků byla použita metoda Stage Tip. Aktivace C18 kolonek byla provedena přidáním 100 µl metanolu a centrifugací při 3 000 g 2 min. Na kolonky bylo přidáno 100 µl 80% ACN, 0,1% AA a následovala centrifugace při 3 000 g 2 min. Kolonky byly propláchnuty 100 µl AA a centrifugovány 2 min 3 000 g. Byly naneseny vzorky s obsahem 10 µg peptidu a opět byla provedena centrifugace. Následovalo propláchnutí kolonek 100 µl 0,1% AA. Kolonky byly přeneseny do nových zkumavek a byla provedena eluce 100 µl 80% ACN, 0,1% AA. Obsah zkumavek byl poté odpařen a rozpuštěn v 50 µl 0,1% TFA. Takto připravené vzorky byly přeneseny do vialek, čímž byly připraveny pro MS analýzu.

4.7.5 LC-MS/MS analýza

Vzorky byly separovány pomocí kapalinového chromatografu Dionex UltiMate 3000 a LC-MS/MS analýza byla provedena s využitím hmotnostního spektrometru Thermo Orbitrap Elite. HPLC separace zahrnovala odsolení na Acclaim PrepMap 100 koloně (100 µm x 2 cm, C18, 5 µm, 100 Å) a analytickou separaci na PrepMap RSLC (75 µm x 50 cm, C18, 2 µm, 100 Å). Pro nanesení vzorku a odsolení byla využita HPLC nanášecí pumpa s průtokem 6 µl/min a 1% acetonitril s 0,05% kyselinou trifluoroctovou. 10 min po nanesení byl ventil kolony přepnut a separace byla provedena pomocí nanopumpy s průtokem 300 nl/min do 125. min s rostoucím gradientem mobilní fáze B (od 2 % do 40 %). Jako mobilní fáze A byla použita 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a jako mobilní fáze B sloužila 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Po uplynutí 125 min byla kolona 10 min čištěna 95% B a byla ekvilibrována 2% B do ukončení běhu (tj. do 165. min).

Rozlišení Orbitrapu bylo nastaveno na hodnotu 120 000 a hmotnostní rozsah na hodnotu 350–1 500. Fragmentace byla provedena pomocí lineární iontové pasti využívající CID fragmentační mód.

Jako kontroly sloužily vzorky hovězího sérového albuminu, které byly injektovány vždy před a po šarži vzorků a také mezi každou 10. injekcí.

4.7.6 Zpracování dat a vyhodnocení v programu Proteome Discoverer

Zpracování raw dat bylo provedeno v programu Thermo Proteome Discoverer 2.4.0.305. V rámci funkce ‘Spectrum files re-calibration‘ byla použita databáze UniProt (Uniprot_organism_human_20190311) s trypsinem jako štěpícím enzymem. Dále byly nastaveny parametry pro očekávané modifikace, jako statická modifikace byla nastavena karbamidomethylace cysteinu a jako dynamické modifikace byly zvoleny oxidace methioninu a acetylace N-konce proteinu. Jako minimální délka peptidu byla nastavena hodnota 6 aminokyselin. Pro výběr prekurzoru u funkce ‘Spectrum Selector‘ bylo zvoleno rozpětí 300–5 000 Da, nejnižší náboj 2 a nejvyšší náboj 4, ‘threshold‘ intenzita byla nastavena na 2 000.

Prohledávání bylo provedeno pomocí algoritmu SequestHT, bylo nastaveno vynechání maximálně 2 štěpných míst, minimální délka peptidu 6 aminokyselin a maximální délka 144 aminokyselin. Hmotnostní tolerance prekurzoru byla nastavena na 10 ppm a hmotnostní tolerance fragmentu na 0,6 Da. Validita prohledávání byla zkontrolována pomocí funkce ‘Percolator‘, přičemž validace byla založena na ‘q-value‘. Chromatografické vlastnosti byly zhodnoceny použitím funkce ‘Minora Feature detection‘.

Konsensuální protokol byl zahájen extrakcí identifikovaných nebo kvantifikovaných peptidů z ‘MSF Files‘. ‘Feature Mapper‘, v první větvi, byl využit pro vyrovnání retenčního času s maximálním posunem 10 min a s hodnotou 5 pro minimální signál/šum ‘treshold‘. ‘Precursor Ion Quantifier‘ provedl label-free kvantifikaci na základě unikátních peptidů, přičemž byly brány v úvahu proteinové skupiny a sdílené kvantifikační výsledky. Druhá větev konsensuálního postupu, začínající z ‘MSF Files‘, byla zaměřena na validaci peptidů a proteinů, kdy první funkcí byl ‘PSM Grouper‘ se ‘Site Probability Treshold‘ s hodnotou 95. Následoval ‘Peptide Validator‘ s automatickým validačním módem se ‘Strict Target FDR‘ 0,01 a ‘Relaxed Target FDR‘ 0,05. Validované peptidy byly zpracovány využitím ‘Peptide and Protein Filter‘ (s vysokou jistotou a minimální délkou peptidu 6 aminokyselin). Zahrnutí výsledků s nízkou jistotou a vynechání peptidů bez reference bylo nastaveno

na 'False'. Minimální počet peptidových sekvencí byl nastaven na 2. Následoval 'Protein Scorer' spojený s 'Protein FDR Validator', který byl nastaven na 'Strict FDR' 0,01 a 'Relaxed FDR' 0,05 a s funkcí 'Protein Grouping' využívající 'Apply Strict parsimony'.

4.7.7 Zpracování dat a vyhodnocení v programech MaxQuant a Perseus

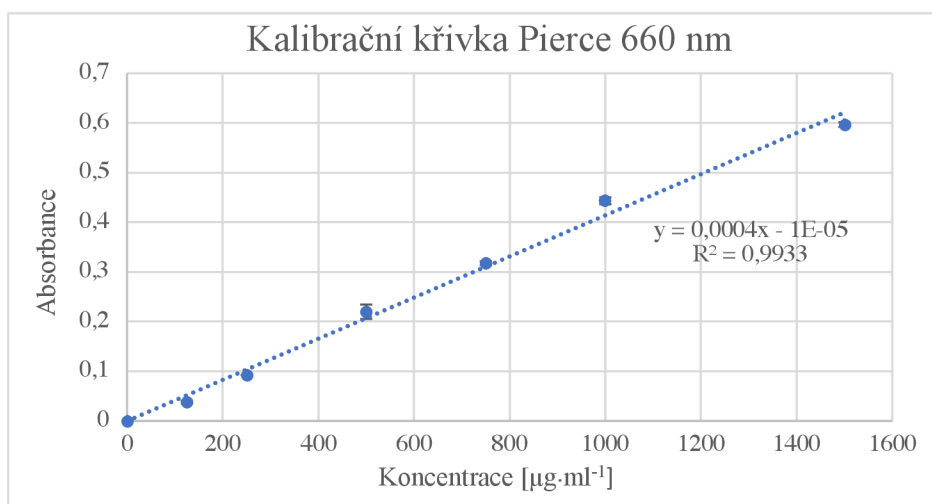
Raw data byla pro porovnání vyhledána i v programu MaxQuant 1.6.2.10. Pro vyhledávání byla použita databáze UniProt_organism_human_20190311 a vyhledávací algoritmus Andromeda. U některých předem daných parametrů byly provedeny změny v nastavení, štěpicím enzymem byl zvolen Trypsin/P a bylo nastaveno vynechání maximálně 2 štěpných míst. Dále byly nastaveny modifikace, fixní modifikací byla zvolena karbamidometylace cysteinu a jako variabilní modifikace byly nastaveny oxidace methioninu a acetylace N-konce proteinu. Byla zvolena label-free kvantifikace a také byla nastavena funkce 'match between runs'. Minimální délka peptidu byla nastavena na 7 aminokyselin a jako decoy databáze byla použita sekvence z původní databáze v opačném směru čtení.

Soubor PeptideGroups.txt byl nahrán do programu Perseus 1.6.2.2., ve kterém bylo provedeno vyhodnocení dat. Byly vyfiltrovány a odebrány proteiny identifikované v rámci decoy databáze, potenciální kontaminanty a proteiny identifikované modifikovaným peptidem. Na základě těchto úprav byla vytvořena heat mapa a PCA plot, stejně jako v případě Proteome Discoverer programu.

5 VÝSLEDKY

Bioinformatická analýza a vyhodnocení byly provedeny pro sadu dříve zpracovaných vzorků cervikálních hlenů, a to z důvodu technické poruchy hmotnostního spektrometru v době realizace experimentální části diplomové práce.

Vzorky cervikálního hlenu jsou složitého, komplexního charakteru a u jejich přípravy pro MS analýzu je nutno nejprve připravit homogenní směs. Toho bylo dosaženo sonikací vzorků ve FASP lyzačním pufru ultrazvukovou jehlou Sonopuls. U připravených vzorků byly zjištěny hodnoty absorbance pomocí metody Pierce 660 nm a byly vypočítány neznámé koncentrace proteinů (Obrázek 8, Tabulka 1).



Obrázek 8: Závislost absorbance na koncentraci standardů pro výpočet neznámých koncentrací vzorků cervikálního hlenu.

Tabulka 1: Koncentrace proteinů ve vzorcích cervikálního hlenu.

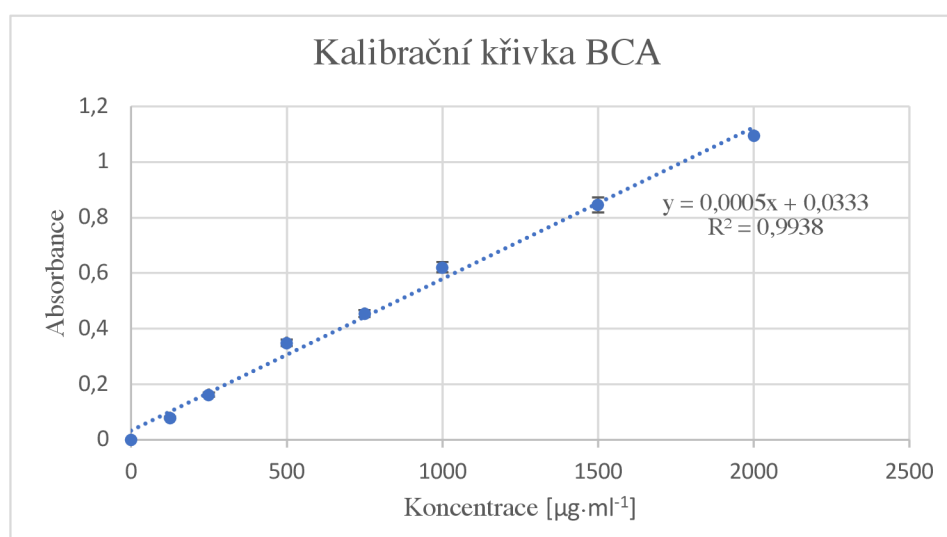
Vzorek	c [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Vzorek	c [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Vzorek	c [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
65	172,50	111	263,78	161	322,53
69	567,53	114	150,03	166	90,03
79	1566,28	115	281,28	177	73,78
83	398,78	119	40,03	178	271,28
90	241,28	133	80,03	193	52,53
96	125,03	145	118,78	196	1276,28
102	871,28	146	1357,53	214	398,78
104	897,53	148	42,53	216	67,53
107	68,78	152	577,53	210101	938,78
108	103,78	154	1230,03	210206	712,53

Dle návodu byla provedena metoda FASP, na membrány bylo naneseno 100 µg proteinů (nebo maximální možné množství; Tabulka 2) a bylo provedeno enzymatické štěpení pomocí Trypsin/LysC Mix.

Tabulka 2: Množství vzorků v µg pro aplikaci na membránu pro FASP.

Vzorek	m [µg]	Vzorek	m [µg]	Vzorek	m [µg]
65	69,01	111	100,00	161	100,00
69	100,00	114	60,01	166	36,01
79	100,00	115	100,00	177	29,51
83	100,00	119	16,01	178	100,00
90	100,00	133	32,01	193	21,01
96	50,01	145	47,51	196	100,00
102	100,00	146	100,00	214	100,00
104	100,00	148	17,01	216	27,01
107	27,51	152	100,00	210101	100,00
108	41,51	154	100,00	210206	100,00

Po štěpení byly zjištěny koncentrace peptidů pomocí metody BCA (Obrázek 9) a byl vypočítán objem s obsahem 10 µg peptidu, přičemž 5 vzorků bylo vyřazeno a u dvou (65 a 104) byly hodnoty přepočítány na poloviční množství (Tabulka 3).



Obrázek 9: Závislost absorbance na koncentraci vzorků standardů pro zjištění objemů vzorků s obsahem 10 mg peptidu.

Tabulka 3: Objemy vzorků s obsahem 10 µg peptidu (vz. 65 a 104: 5 µg peptidu).

Vzorek	V [µl]	Vzorek	V [µl]	Vzorek	V [µl]
65	120,77	115	66,49	178	101,63
79	22,50	119	13,45	193	20,52
90	105,93	145	160,26	196	45,37
96	14,72	146	19,59	214	146,20
102	114,42	148	45,17	216	16,85
104	196,85	154	21,72	210101	23,18
107	19,29	161	65,19	210206	24,79
108	174,22	166	18,07		
111	26,50	177	30,92		

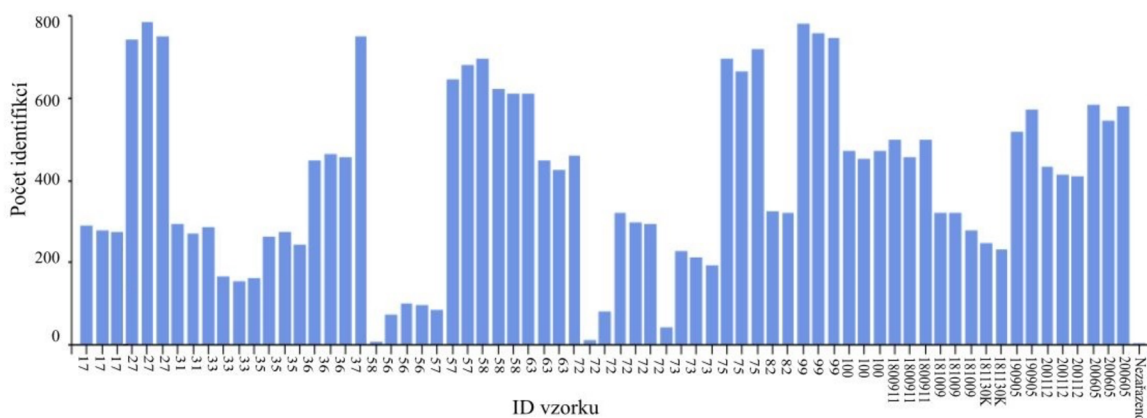
U vzorků byla provedena precipitace detergentů ledovým acetonem, následovaná purifikací peptidů na Stage Tip kolonkách. Vzorky byly odpařeny a rozpuštěny v 0,1 % TFA, čímž byly připraveny pro MS analýzu.

Pro MS analýzu byl využit hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite firmy Thermo Fisher Scientific.

Data dříve změřených vzorků byla zpracována v programech Proteome Discoverer 2.4.0.305 a MaxQuant 1.6.2.10. Bylo vyzkoušeno několik optimalizačních variant vyhledávání a byly zvoleny metody s nejvyšším počtem identifikací.

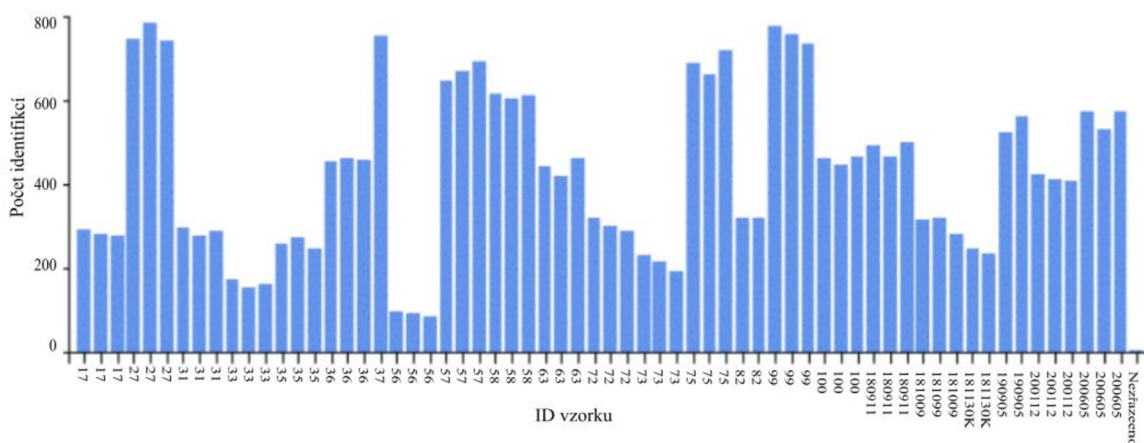
5.1 Vyhodnocení v programu Proteome Discoverer

V rámci vyhledávání v programu Proteome Discoverer bylo identifikováno celkem 15 812 proteinů, z čehož 2 531 bylo označeno jako ‘Master’. Byl vytvořen graf znázorňující počet identifikovaných proteinů ve vzorcích. Rozptýl těchto identifikací se v jednotlivých vzorcích velmi liší, u několika vzorků bylo identifikováno pouze malé množství proteinů (okolo 20), ovšem u většiny vzorků se hodnoty pohybovaly v rámci stovek identifikací (Obrázek 10).



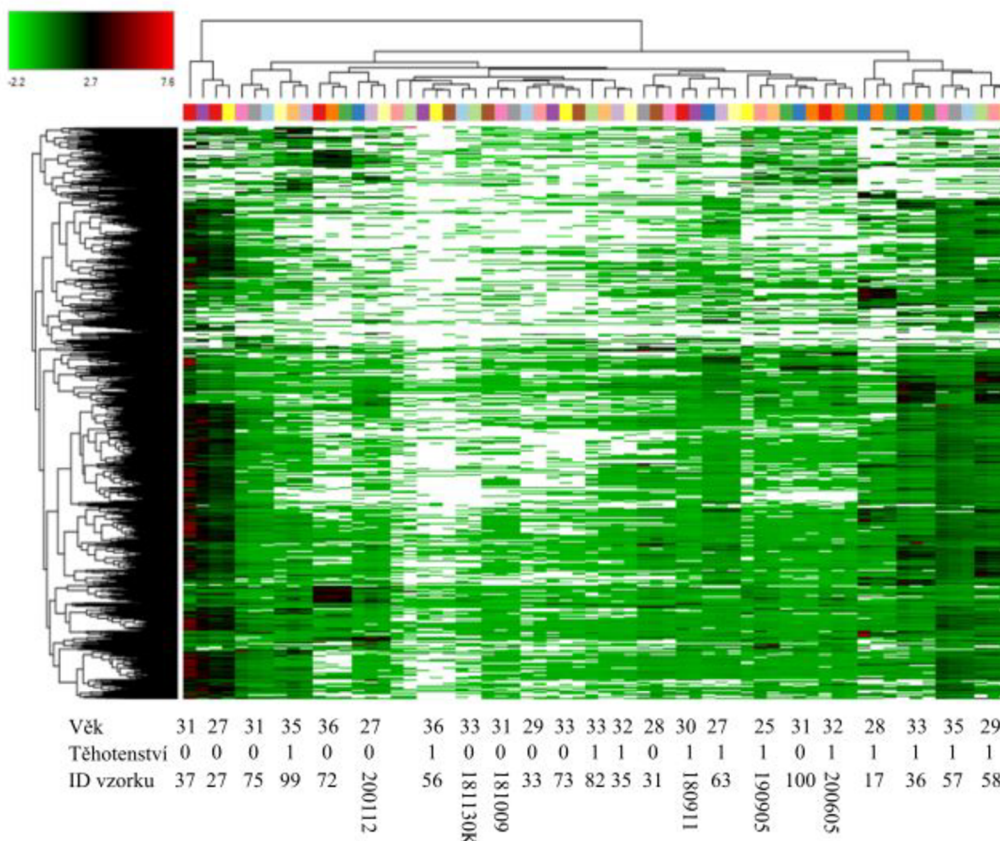
Obrázek 10: Graf znázorňující počty identifikovaných proteinů v jednotlivých vzorcích.

Byla provedena úprava výběru vzorků a byly odebrány vzorky s minimálním počtem identifikací (Obrázek 11).



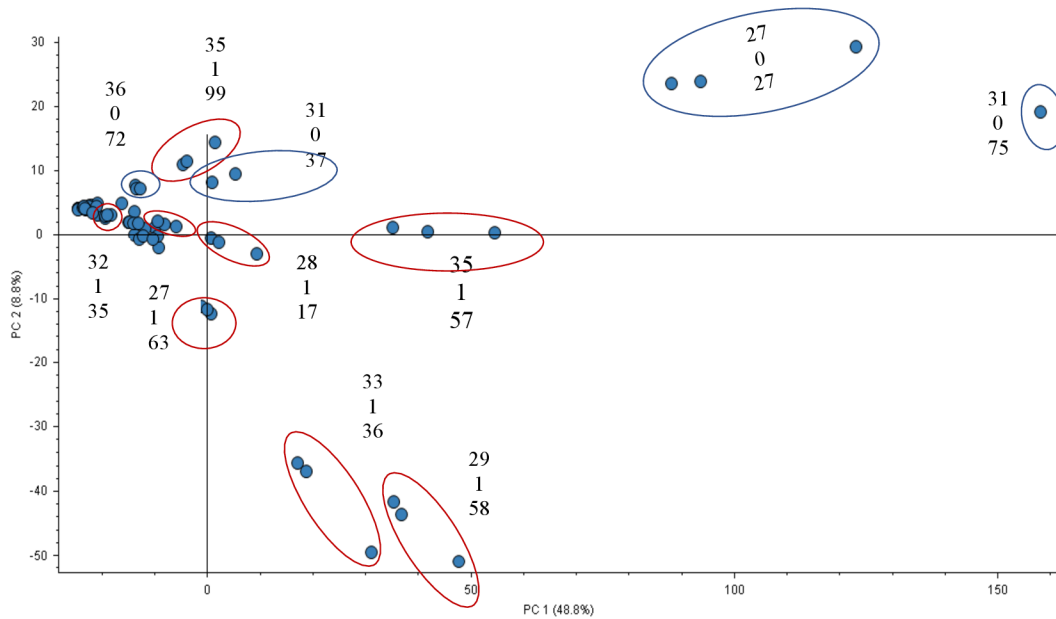
Obrázek 11: Graf počtu identifikovaných proteinů v jednotlivých vzorcích po odstranění vzorků s minimálními počty.

Zároveň byla vytvořena heat mapa a následně i PCA plot (Obrázky 12 a 13). V rámci tří hlavních vytvořených klastrů heat mapy se oddělil jeden, ve kterém všechny vzorky patřily pacientkám, které byly gravidní (vzorky 17, 36, 57 a 58). Tento klaster by mohl představovat potenciální zdroj dalšího studia identifikace a charakterizace diagnostických biomarkerů receptivity endometria.



Obrázek 12: Heat mapa výsledků vzorků cervikálního hlenu vytvořena v programu Proteome Discoverer.
Legenda: Anotace klastrů na základě ID vzorku, věku a těhotenství pacientek (0 ne, 1 ano).

Po vytvoření PCA plot grafu (Analýza hlavní komponenty) došlo k rozřazení vzorků do několika skupin, ve kterých věk nebyl hlavním odlišujícím parametrem. Vzorky jsou děleny spíše podle úspěšnosti otěhotnění. Většina vzorků se sdružila do jedné skupiny zahrnující jak těhotné, tak netěhotné pacientky, ale také lze pozorovat podobnou distribuci vzorků těhotných pacientek ve spodní polovině PCA plot grafu. Tato skutečnost bude předmětem dalšího zkoumání.



Obrázek 13: Analýza hlavní komponenty pro vzorky cervikálního hlenu provedena v programu Proteome Discoverer.

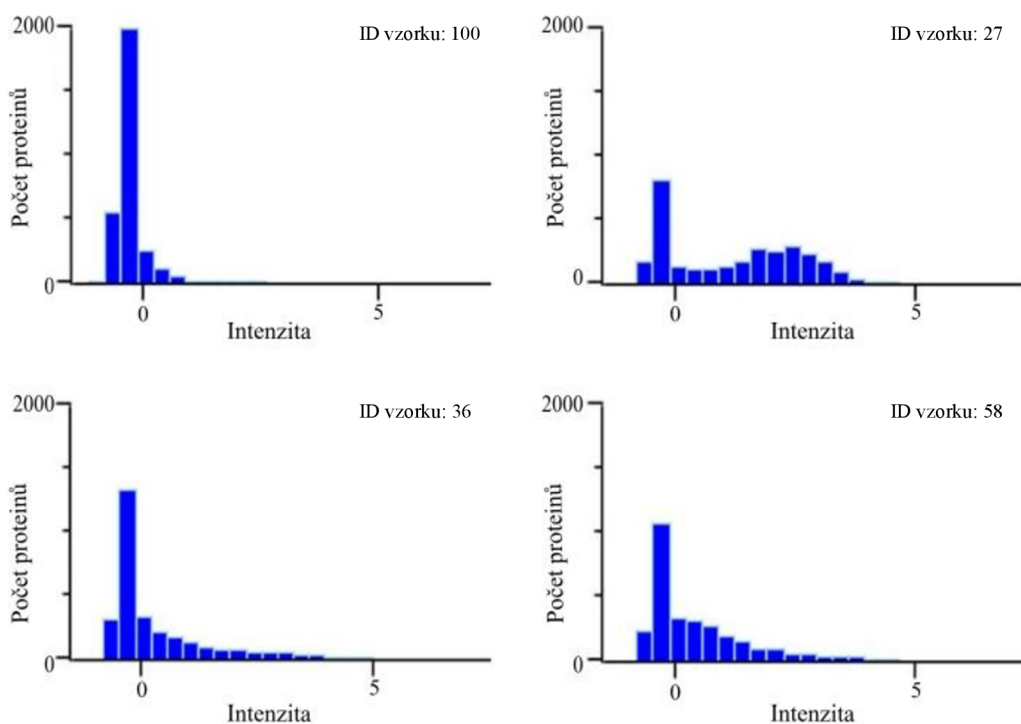
Legenda: Horní údaj – věk pacientky; prostřední údaj – těhotenství (0 ne, 1 ano), spodní údaj – ID vzorku; červené ohraničení – vzorky těhotných pacientek

5.2 Vyhodnocení v programech MaxQuant a Perseus

Pomocí programů MaxQuant a Perseus bylo identifikováno celkem 3 343 proteinů. Po použití filtrů k odstranění kontaminantů, proteinů identifikovaných v ‘decoy‘ databázi a proteinů identifikovaných modifikovanými peptidy, odpovídal konečný počet 3 133 proteinům.

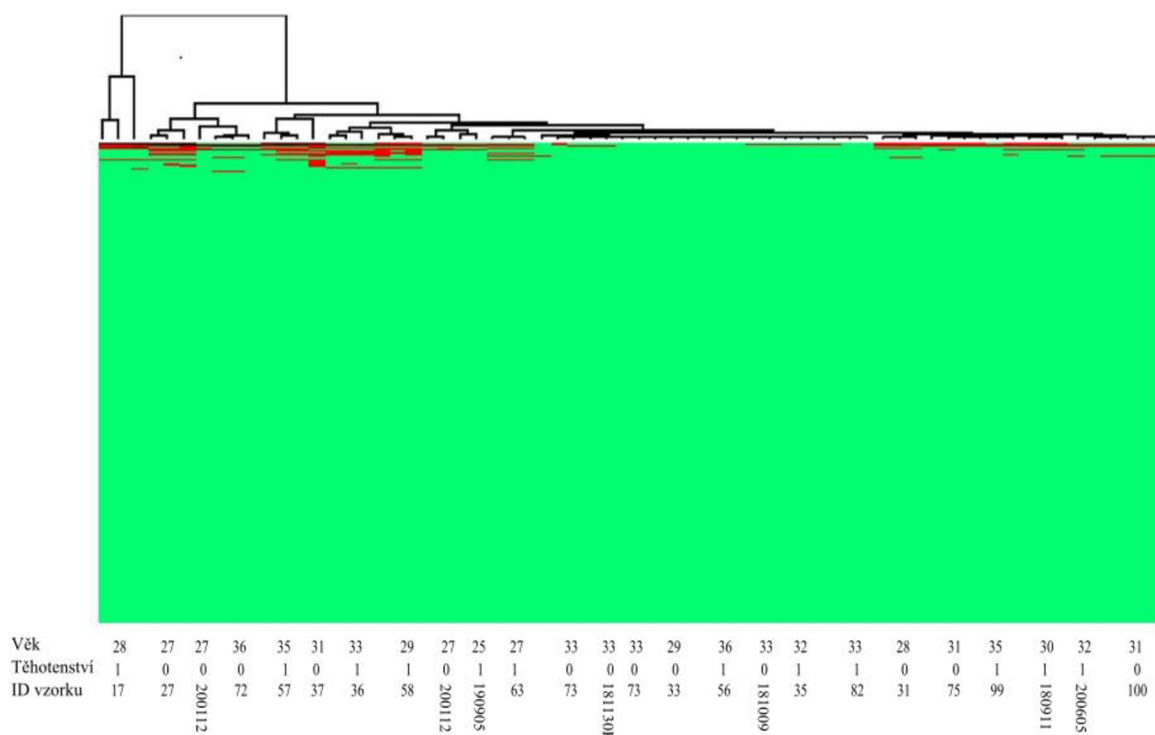
Pro jednotlivé vzorky byly v programu vytvořeny histogramy na základě naměřených intenzit. Nejprve byla provedena normalizace hodnot využitím funkce Z-skóre (průměr každého řádku/sloupce je odečten od každé hodnoty a výsledek je následně vydělen směrodatnou odchylkou daného řádku/sloupce) a poté byla využita funkce imputace, ‘Replace missing values from normal distribution‘ (chybějící hodnoty jsou doplněny náhodnými hodnotami, které vychází z klasické distribuce) (Obrázek 14).

Na uvedených příkladech histogramů jednotlivých vzorků lze sledovat rozdíly v intenzitách zastoupených proteinů, např. ve vzorku 100 se bylo identifikováno velké množství proteinů s nízkou intenzitou, oproti tomu se ve vzorku 27 vyskytuje vyšší množství proteinů se silnější intenzitou. U vzorků 36 a 58 je přítomno více proteinů s vyšší intenzitou, což znázorňuje i níže uvedená heat mapa (Obrázek 15).



Obrázek 14: Histogramy znázorňující intenzity proteinů v jednotlivých vzorcích cervikálních hlenů vytvořené v programu Perseus.

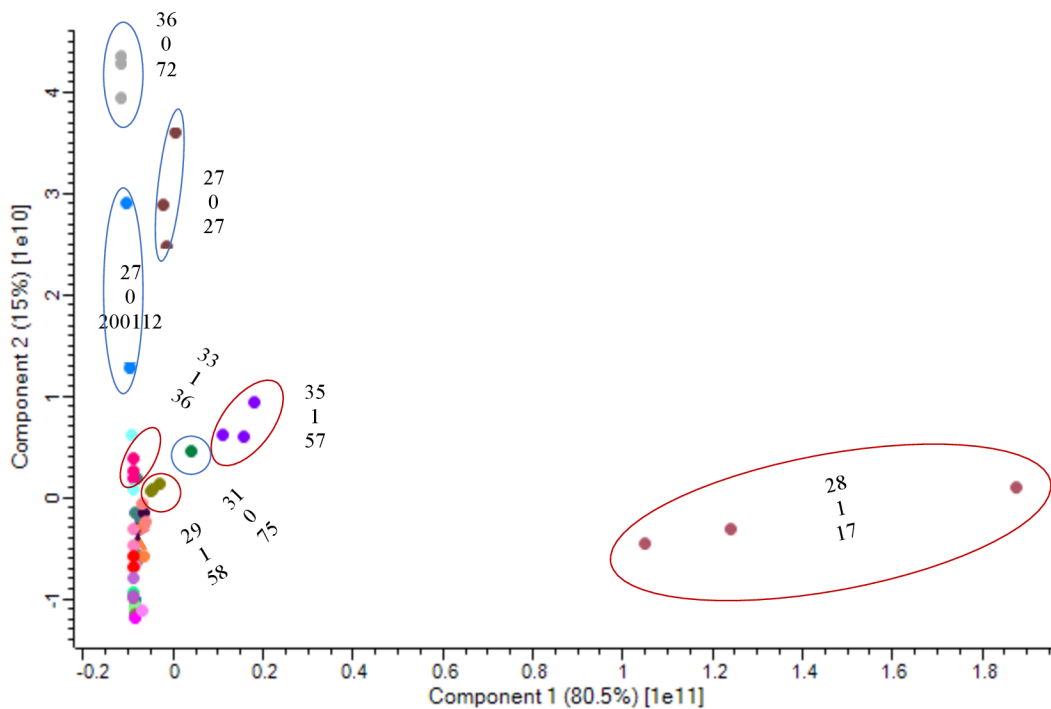
Byla vytvořena heat mapa (Obrázek 15), ve které došlo k rozdělení vzorků do několika skupin. Získané intenzity byly velmi nízké a vzorky gravidních pacientek odpovídající jednomu klastru (identifikované v Proteome Discoverer programu) se v tomto případě rozdělily odlišným způsobem, což je způsobeno skutečností, že byly využity dva různé programy pro vyhledávání. Vzorek 17 představuje samostatnou větev. Společnou skupinu ale tvoří vzorky 36 a 58. Vzorek 57 vytvořil samostatnou skupinu.



Obrázek 15: Heat mapa výsledků vzorků cervikálního hleny vytvořena v programu Perseus.

Legenda: Anotace klastrů na základě ID vzorku, věku a těhotenství pacientek (0 ne, 1 ano).

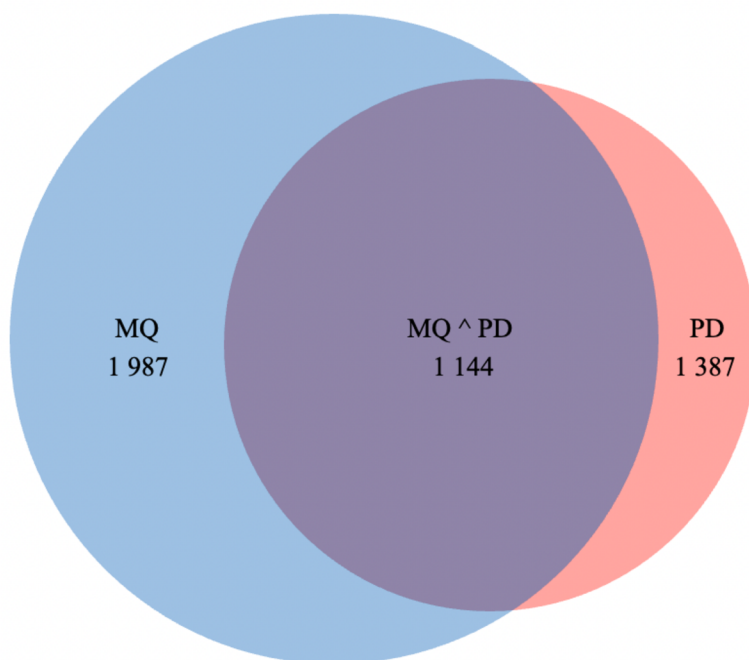
Následně byl vygenerován PCA plot (Obrázek 16), stejně jako v případě použití předchozího programu. Pro rozdělení vzorků opět nebyl hlavním parametrem věk pacientky. Kromě vzorku 17 se sledované vzorky těhotných pacientek sdružují blízko sebe, vzorky 36 a 58 v heat mapě vytvořily jeden klastr, a i v PCA plot rozdělení jsou umístěny blízko sebe.



Obrázek 16: Analýza hlavní komponenty pro vzorky cervikálního hlenu provedena v programu Perseus.
Legenda: Horní údaj – věk pacientky; prostřední údaj – těhotenství (0 ne, 1 ano); spodní údaj – ID vzorku; červené ohrazení – vzorky těhotných pacientek

5.3 Srovnání výsledků vyhledávání

Výsledky vyhledávání získané v programech MaxQuant a Proteome Discoverer byly porovnány a byl vytvořen Vennův diagram. V programu MaxQuant bylo celkem identifikováno 3 133 proteinů a v programu Proteome Discoverer tato hodnota odpovídala 2 531 proteinům. Oba programy shodně identifikovaly 1 144 proteinů. Počet proteinů, které byly identifikovány jen programem MaxQuant odpovídal 1 989 a počet proteinů, které byly identifikovány pouze programem Proteome Discoverer byl 1 387 (Obrázek 17).



Obrázek 17: Vennův diagram znázorňující počet identifikovaných proteinů pouze v programu MaxQuant (MQ), pouze v programu Proteome Discoverer (PD) a proteinů identifikovaných v obou programech (MQ^PD).

5.4 Analýza získaných výsledků

Byly vybrány proteiny přítomné u všech vzorků těhotných pacientek ze samostatného klastru (Obrázek 12; ID vzorku: 17, 36, 57 a 58) s vysokou intenzitou, a byly vyhledány jejich biologické funkce v lidském organismu (Tabulka 4). V heat mapách obou programů sice došlo k odlišnému rozdělení těchto vzorků, ale v PCA plot grafech lze pozorovat jejich podobné rozložení (odchylka jen u vzorku 17). Tyto vzorky byly vybrány, jelikož by mohly potenciálně představovat základ dalšího výzkumu.

Tabulka 4: Proteiny s nejvyšší intenzitou u vzorků vybraných těhotných pacientek (ID vzorku: 17, 36, 56 a 57).

Označení	Název proteinu	Biologická funkce
P04406	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	Imunita
H6VRF8	Keratin I	Strukturální protein
P00338	L-laktát dehydrogenáza A řetězec	Metabolismus
A0A024R1N1	Myosin, H polypeptid 9, nesvalová izoforma CRA_a	Aktin vazebná funkce Motor protein
P13639	Elongační faktor 2	Biosyntéza proteinů
P02647	Apolipoprotein A-I	Transport Aktivace motility spermií
P02790	Hemopexin	Transport
C0JYY2	Apolipoprotein B, izoforma CRA_a	Transport
P03973	Antileukoproteináza	Imunita
P04083	Annexin A1	Imunita
P01008	Antithrombin-III	Koagulace, hemostáze
P98088	Mucin-5AC	Strukturální protein
P01024	Complement C3	Imunita
P02671	Fibrinogen alfa řetězec	Adaptivní imunita Koagulace Hemostáze
P21333	Filamin-A	Vazebná funkce
P01023	Alfa-2-makroglobulin	Zánětlivá reakce
V9GYM3	Apolipoprotein II	Transport lipidů
V9HW88	Calreticulin, izoforma CRA_b	Sbalování proteinů Spermatogeneze

Dále byly výsledky srovnány s dostupnou literaturou (Andersch-Björkman *et al.*, 2007; Grande *et al.*, 2015) a vybrané proteiny byly rozděleny do následujících skupin: konstitutivně exprimované proteiny, proteiny pre-ovulační fáze, proteiny ovulační fáze a proteiny post-ovulační fáze (Tabulka 5).

Tabulka 5: Identifikované proteiny u vzorků vybraných těhotných pacientek (ID vzorku: 17, 36, 57 a 58) rozdělené na základě exprese dle fáze ovulačního cyklu.

Označení	Název proteinu	Biologická funkce
Konstitutivně exprimované proteiny		
P06702	Protein S100-A9	Imunita
P03973	Antileukoproteináza	Imunita
P02647	Apolipoprotein A-I	Transport Aktivace motility spermií
Proteiny pre-ovulační fáze		
P04083	Annexin A1	Imunita
V9GYM3	Apolipoprotein II	Transport lipidů
Proteiny ovulační fáze		
P98088	Mucin-5AC	Strukturální protein
Proteiny post-ovulační fáze		
H6VRF8	Keratin I	Strukturální protein

6 DISKUSE

Neplodnost je stále častěji diskutovaným problémem napříč společnostmi, tento trend je zapříčiněn zejména zvyšujícím se věkem budoucích rodičů, stresovou zátěží v rámci osobních i pracovních vztahů nebo zdravotními a nutričními návyky, které jsou rozšířené ve společnosti. Ačkoliv jsou například věk či váha důležitými parametry (mimo problémy na úrovni genetiky), velký význam má i stres a faktory okolí budoucích rodičů.

Společenské vnímání je založeno na důležitosti, která je rodičovství připisována. V mnoha kulturách je tlak vytvářen v rámci rodin nebo celých sousedství a komunit. Jakmile nastanou problémy s otěhotněním, musí se lidé tedy vyrovnávat i s reakcemi okolí. Velmi často jsou používány pojmy jako 'tikající biologické hodiny', 'snižování výdrže, síly a vitality' v rámci snižujících se zásob vajíček a snižování kvality spermií. Důvodem těchto problémů je, že je neplodnost vnímána jako sociální problém, který vede ke stigmatizaci a případnému vyloučení jedince z rodiny/komunity (Grande *et al.*, 2015).

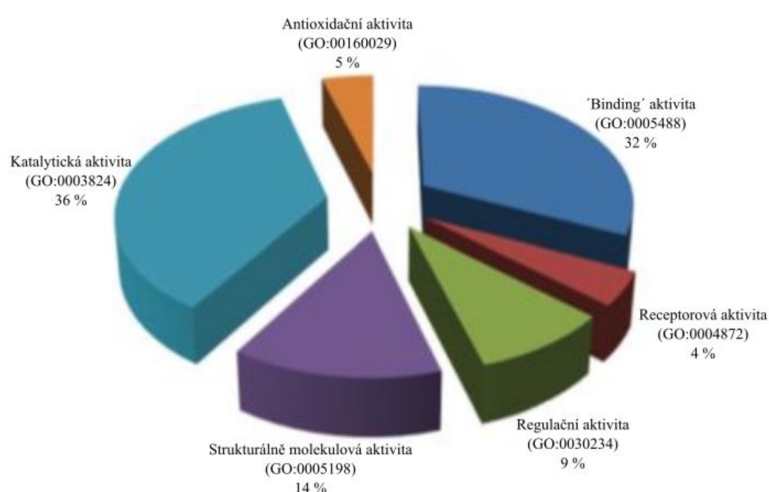
Pokusů o zvýšení účinnosti IVF léčby neplodnosti neustále přibývá a bylo provedeno několik různě zaměřených studií.

Li-Jun Tang s kolegy identifikoval 60 proteinů v lidské cervikovaginální tekutině, přičemž 47 % bylo plazmatického původu. Část proteinů pocházela z buněk vrozené imunitní odpovědi, některé byly sekrečními produkty aktivovaných fagocytů, které se s velkou pravděpodobností vyskytují v ženském genitálním traktu v období zánětu. Identifikovanými proteiny neutrofilů jsou: laktoferin, calgranulin A a B nebo annexin A1 a A3 (Tang *et al.*, 2007).

V roce 2007 Andersch-Björkman s kolegy publikoval studii, jejímž hlavním cílem byla identifikace změn cervikálního hlenu během menstruačního cyklu. Bylo identifikováno celkem 194 proteinů pokrývajících velkou škálu proteinových funkčních tříd spojených s biologickými procesy buněčného i sekrečního charakteru (Andersch-Björkman *et al.*, 2007).

V cervikálním hlenu bylo identifikováno 42 specifických proteinů pro pre-ovulační fázi, a to včetně cystatinu C (marker pre-ovulační fáze), clusterinu (kontrola aglutinace abnormálních spermatozoí) nebo glycodelinu (inhibice funkce spermií). V post-ovulační fázi bylo identifikováno 17 specifických proteinů včetně enzymu triosafosfát isomerasy,

strukturních proteinů kreatinů I a II nebo řetězců spectrinu a dyneinu, které jsou nezbytné pro udržování a organizaci filament. Byla zjištěna i přítomnost E3 ubiquitin-protein ligasy SH3RF2 v období ovulace a E3 ubiquitin-protein ligasy Topors v pre-ovulační fázi cyklu, přičemž tyto komplexy se podílejí na degradaci proteinů. Po provedení bioinformatické analýzy bylo zjištěno, že hlavní část složek má katalytickou aktivitu (36 %) a druhá nejpočetnější skupina je tvořena vazebnými proteiny (32 %), které jsou odpovědné za protein-protein interakce (Obrázek 18) (Grande *et al.*, 2015).



Obrázek 18: Analýza proteinů podle gene ontology (GO) anotací molekulárních funkcí. Převzato a přeloženo z Grande *et al.*, 2015.

V roce 2017 byl také publikován článek zabývající se identifikací biomarkeru ve spojitosti s diagnostikou lidského papilloma viru (HPV). Bylo zjištěno, že klasifikace proteomu cervikovaginální tekutiny je velmi složitá. Hlavní biologické role připadají k metabolismu a modifikaci proteinů, imunitní odpovědi a obraně. Z hlediska lokalizace se většina identifikovaných proteinů nacházela v cytoplazmě nebo extracelulárním prostoru. I přes to, že jsou proteiny považovány za kvalitní kandidáty diagnostických biomarkerů, nebyl zatím vytvořen žádný diagnostický panel (Van Ostade *et al.*, 2018).

S využitím label-free kvantitativní proteomiky založené na LC-ESI-MS/MS byla identifikována aberantní exprese 27 proteinů v případě spinocelulárního karcinomu, přitom některé jsou považovány za potenciální biomarkery: alfa-aktinin-4, vitronectin, annexin A1 (ANXA1) a annexin A2 (ANXA2). Nejslibněji se jeví unikátní peptid (FIENEEQEYVQTVK) náležící ANXA1, který byl down-regulován v případě endocervikálního adenokarcinomu (EAC) a adenokarcinomu *in situ* (AIS) (Shi *et al.*, 2021).

V rámci této diplomové práce bylo v programu Proteome Discoverer 2.4.0.306 identifikováno celkem 15 812 proteinů ve vzorcích cervikálního hlenu, z toho 2 531 bylo označeno jako 'Master'. V programu MaxQuant 1.6.2.10 a Perseus 1.6.2.2 počet identifikací odpovídal 3 343 a po použití filtrů 3 133. V případě programu Proteome Discoverer vytvořená heat mapa poskytla tři samostatné klastry, přičemž jeden byl tvořen pouze vzorky, které patřily gravidním pacientkám. Heat mapa vytvořená v programu Perseus rozdělila vzorky jiným způsobem, ale i tak sledované vzorky tvoří buď samostatné klastry, nebo se sdružují (vzorky 36 a 58).

V obou programech byly také vytvořeny PCA plot grafy, ve kterých nehrál věk významnou roli pro rozdělení vzorků. Parametrem rozdělení je tedy spíše gravidita pacientek. V obou PCA plot grafech lze pozorovat společnou pozici vzorků 36 a 58, společnou skupinu tvoří i v obou vytvořených heat mapách.

Odlišné rozdělení vzorků v rámci heat map a PCA plotů je dáno použitím odlišných vyhledávacích programů využívajících odlišné algoritmy pro identifikace. Z tohoto důvodu byl vytvořen Vennův diagram, který znázorňuje, kolik proteinů bylo identifikováno pouze programem MaxQuant nebo Proteome Discoverer, a kolik proteinů bylo identifikováno shodně oběma programy (Obrázek 17).

U skupiny vzorků těhotných pacientek byly následně vybrány proteiny s nejvyšší intenzitou. Většinu tvoří proteiny podílející se na imunitních funkcích, ovšem zastoupeny byly i proteiny s transportní či strukturální funkcí. Proteiny byly rozděleny také na základě exprese v různých fázích ovulace. Ve vzorcích byl identifikován protein Annexin A1 (pre-ovulační fáze), který se podílí na imunitní odpovědi a je velmi často zmiňován v rámci studií zabývajících se charakterizací proteinů cerviko-vaginální tekutiny nebo gynekologických onemocnění žen. Dále pak Mucin 5-AC (ovulační fáze) nebo Keratin I (post-ovulační fáze), přičemž oba představují důležité strukturální proteiny.

Mezi proteiny, které jsou v několika studiích označovány jako potenciální markery, a jsou dávány do souvislosti s neúspěšným otěhotněním, patří: BCL6, aromatasa P450, α -inhibin a β -glycan, integriny a L-selectin ligand (Almquist *et al.*, 2017; Silveira *et al.*, 2017). Při prohledávání vzorků náležících klastru těhotných pacientek nebyl ani jeden z uvedených proteinů identifikován, proto se lze domnívat, že námi prezentovaná data jsou v souladu s výše zmiňovanými studiemi.

Úspěšná implantace je založena na mnoha interakcích mezi embryem a endometriem. Studované markery nelze prozatím uvést do klinické praxe, jelikož byly testovány v rámci menších samostatných studií a jejich průkazní hodnota je nízká či nedostatečně podložená. A to především z důvodu nezahrnutí prognostických faktorů do studií, jejich nekonzistentností a výraznou heterogenitou. Receptivita a selektivita jsou dvěma hlavními funkcemi endometria, které slouží k rozpoznání kvalitního embrya a zaručují jeho vývoj. Embrya s nízkou kvalitou či potenciálem pro správný vývin mají nižší pravděpodobnost implantace (Craciunas *et al.*, 2019). I přes to, že byly vyvinuty diagnostické soupravy testující receptivitu endometria (ERA), nebyl doposud představen žádný proteomický panel biomarkerů, které by mohly přispět ke zvýšení účinnosti IVF. Z tohoto důvodu je nezbytné pokračovat v dalším zkoumání.

7 ZÁVĚR

Cílem teoretické části této diplomové práce byla literární rešerše přibližující problematiku *In vitro* fertilizace a celkového procesu oplodnění, společně s popisem proteomického přístupu analýzy a bioinformatického zpracování proteomických dat.

Praktická část práce byla založena na provedení necílené proteomické analýzy vzorků cervikálních hlenů, odebraných na základě informovaného souhlasu pacientek, se zaměřením na vyhodnocování a statistickou analýzu získaných dat.

U vzorků těhotných pacientek byly identifikovány specifické proteiny pro pre-ovulační, ovulační a post-ovulační fázi. Identifikované proteiny se uplatňují především v imunitních reakcích organismu, dále zajišťují transportní, metabolické a strukturální funkce, což jsou důležité procesy pro úspěšné přijetí embrya. Pro úspěšnou identifikaci diagnostických markerů receptivity endometria je nutné provést další studie u rozsáhlejšího souboru vzorků.

8 LITERATURA

Abbara, A., Clarke, S.A., Dhillon, W.S. (2018): Novel Concepts for Inducing Final Oocyte Maturation in In Vitro Fertilization Treatment. *Endocrine Reviews* 39, 593–628.

Aebersold, R., Agar, J.N., Amster, I.J., Baker, M.S., Bertozzi, C.R., Boja, E.S., Costello, C.E., Cravatt, B.F., Fenselau, C., Garcia, B.A., Ge, Y., Gunawardena, J., Hendrickson, R.C., Hergenrother, P.J., Huber, C.G., Ivanov, A.R., Jensen, O.N., Jewett, M.C., Kelleher, N.L., Kiessling, L.L., Krogan, N.J., Larsen, M.R., Loo, J.A., Ogorzalek Loo, R.R., Lundberg, E., MacCoss, M.J., Mallick, P., Mootha, V.K., Mrksich, M., Muir, T.W., Patrie, S.M., Pesavento, J.J., Pitteri, S.J., Rodriguez, H., Saghatelian, A., Sandoval, W., Schlüter, H., Sechi, S., Slavoff, S.A., Smith, L.M., Snyder, M.P., Thomas, P.M., Uhlén, M., Van Eyk, J.E., Vidal, M., Walt, D.R., White, F.M., Williams, E.R., Wohlschläger, T., Wysocki, V.H., Yates, N.A., Young, N.L., Zhang, B. (2018): How many human proteoforms are there? *Nature Chemical Biology* 14, 206–214.

Aebersold, R., Mann, M. (2016): Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537, 347–355.

Almquist, L.D., Likes, C.E., Stone, B., Brown, K., Savaris, R., Forstein, D.A., Miller, P.B., Lessey, B.A. (2017): Endometrial BCL6 Testing for the Prediction of IVF Outcomes: a Cohort Study. *Fertil Steril* 108, 1063–1069.

Andersch-Björkman, Y., Thomsson, K.A., Holmén Larsson, J.M., Ekerhovd, E., Hansson, G.C. (2007): Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 708–716.

Ben Rafael, Z. (2021): Endometrial Receptivity Analysis (ERA) test: an unproven technology. *Human Reproduction Open*, 2, 1–6.

Benksim, A., Elkhoudri, N., Ait Addi, R., Baali, A., Cherkaoui, M. (2018): Difference between Primary and Secondary Infertility in Morocco: Frequencies and Associated Factors. *Fertility and Sterility* 12, 142–146.

Bhagwat, S.R., Chandrashekar, D.S., Kakar, R., Davuluri, S., Bajpai, A.K., Nayak, S., Bhutada, S., Acharya, K., Sachdeva, G. (2013): Endometrial Receptivity: A Revisit to Functional Genomics Studies on Human Endometrium and Creation of HGEx-ERdb. *PLOS*

One 8, e58419.

Brosens, J.J., Hodgetts, A., Feroze-Zaidi, F., Sherwin, J.R.A., Fusi, L., Salker, M.S., Higham, J., Rose, G.L., Kajihara, T., Young, S.L., Lessey, B.A., Henriot, P., Langford, P.R., Fazleabas, A.T. (2010): Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. *Molecular Human Reproduction* 16, 273–285.

Cena, H., Chiovato, L., Nappi, R.E. (2020): Obesity, Polycystic Ovary Syndrome, and Infertility: A New Avenue for GLP-1 Receptor Agonists. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 105, e2695–e2709.

Chen, M., Huang, J., Zhong, Y., Quan, S., (2015): Embryo selection in IVF/ICSI cycles using time-lapse microscopy and the clinical outcomes. *Journal of Southern Medical University* 35, 1760–1764, 1781.

Čihák, R. (2013a): *Anatomie 2: Třetí, upravené a doplněné vydání*, Grada Publishing, a.s., Praha.

Corona, G., Minhas, S., Giwercman, A., Bettocchi, C., Dinkelman-Smit, M., Dohle, G., Fusco, F., Kadioglou, A., Kliesch, S., Kopa, Z., Krausz, C., Pelliccione, F., Pizzocaro, A., Rassweiler, J., Verze, P., Vignozzi, L., Weidner, W., Maggi, M., Sofikitis, N. (2019): Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 25, 733–757.

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., Mann, M. (2011): Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *Journal of Proteome Research* 10, 1794–1805.

Craciunas, L., Gallos, I., Chu, J., Bourne, T., Quenby, S., Brosens, J.J., Coomarasamy, A. (2019): Conventional and modern markers of endometrial receptivity: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 25, 202–223.

Dar, S., Lazer, T., Shah, P.S., Librach, C.L. (2014): Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 20, 439–448.

Diagnosis of infertility - NHS [online] [navštíveno 24.11.2021] Dostupné z <https://www.nhs.uk/conditions/infertility/diagnosis>

Diagnostic evaluation of the infertile male: A committee opinion, (2015): *Fertility and Sterility* 103, e18–e25.

Edman, P. (1949): A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* 22, 475.

Ellis, H. (2011): Anatomy of the uterus. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine, Neonatal/Obstetrics* 12, 99–101.

Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D.A., Zoumpourlis, V. (2016): The molecular basis of fertilization. *International Journal of Molecular Medicine* 38, 979–986.

Goeminne, L.J.E., Gevaert, K., Clement, L. (2018): Experimental design and data-analysis in label-free quantitative LC/MS proteomics: A tutorial with MSqRob. *Journal of Proteomics* 171, 23–36.

Grande, G., Milardi, D., Vincenzoni, F., Pompa, G., Biscione, A., Astorri, A.L., Fruscella, E., De Luca, A., Messana, I., Castagnola, M., Marana, R. (2015): Proteomic characterization of the qualitative and quantitative differences in cervical mucus composition during the menstrual cycle. *Molecular BioSystems* 11, 1717–1725.

Grande, G., Vincenzoni, F., Milardi, D., Pompa, G., Ricciardi, D., Fruscella, E., Mancini, F., Pontecorvi, A., Castagnola, M., Marana, R. (2017a): Cervical mucus proteome in endometriosis. *Clinical Proteomics* 14, 7.

Häkkinen, J., Levander, F. (2011): Laboratory Data and Sample Management for Proteomics, in: Hamacher, M., Eisenacher, M., Stephan, C. (ed.): *Data Mining in Proteomics, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp. 79–92, Totowa.

Han, L., Taub, R., Jensen, J.T. (2017): Cervical mucus and contraception: what we know and what we don't. *Contraception* 96, 310–321.

Fertility Tests for Women [online] [navštíveno 24.11.2021]. Dostupné z <https://www.webmd.com/infertility-and-reproduction/guide/fertility-tests-for-women1>.

Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R. (2005): The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 430–443.

Humaidan, P., Kol, S., Papanikolaou, E., on behalf of the “The Copenhagen GnRH Agonist Triggering Workshop Group,” (2011): GnRH agonist for triggering of final oocyte

maturation: time for a change of practice? *Human Reproduction Update* 17, 510–524.

Infertility [online] [navštíveno 19.9.2021]. Dostupné z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>.

Jurema, M., Nogueira, D. (2006): In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertility and Sterility* 86, 1277–1291.

Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., Aebersold, R. (2002): Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search. *Analytical Chemistry* 74, 5383–5392.

Kertesz-Farkas, A., Reiz, B., P. Myers, M., Pongor, S. (2012): Database Searching in Mass Spectrometry Based Proteomics. *Current Bioinformatics* 7, 221–230.

Kumar, N., Singh, A.K. (2015): Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences* 8, 191–196.

Kurita, T. (2018): Cervix: Cell Biology, in: *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, pp. 347–352. Columbus, United States.

La Marca, A., Sunkara, S.K. (2014): Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Human Reproduction Update* 20, 124–140.

MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., MacCoss, M.J. (2010): Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26, 966–968.

Makarov, A. (2000): Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* 72, 1156–1162.

Malter, H.E., Cohen, J. (1989): Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertility and Sterility* 51, 139–148.

Mann, S.P., Treit, P.V., Geyer, P.E., Omenn, G.S., Mann, M. (2021): Ethical Principles, Constraints and Opportunities in Clinical Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 100046.

McHugh, L., Arthur, J.W. (2008): Computational Methods for Protein Identification from Mass Spectrometry Data. *PLOS Computational Biology* 4, e12.

Moreno, I., Cicinelli, E., Garcia-Grau, I., Gonzalez-Monfort, M., Bau, D., Vilella, F., De Ziegler, D., Resta, L., Valbuena, D., Simon, C. (2018): The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 218, 602.e1–602.e16.

Moreno, I., Codoñer, F.M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J.F., Jimenez-Almazán, J., Alonso, R., Alamá, P., Remohí, J., Pellicer, A., Ramon, D., Simon, C. (2016): Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 215, 684–703.

Morgan, M., Bell, D. (2015): Testicular and scrotal ultrasound, in: *Radiopaedia.Org*. Radiopaedia.org.

New Thermo Scientific Proteome Discoverer 2.5 software strengthens laboratory workflows [online] [navštíveno 2.11.2021] Dostupné z <https://www.news-medical.net/news/20200528/New-Thermo-Scientific-Proteome-Discoverer-25-software-strengthens-laboratory-workflows.aspx>

Okabe, M. (2014): Mechanism of fertilization: A modern view. *Experimental Animals* 63, 357–365.

Palermo, G. (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet* 340, 17–18.

Palmblad, M., Lamprecht, A.-L., Ison, J., Schwämmle, V. (2019): Automated workflow composition in mass spectrometry-based proteomics. *Bioinformatics* 35, 656–664.

Panicker, G., Ye, Y., Wang, D., Unger, E.R. (2010): Characterization of the Human Cervical Mucous Proteome. *Clinical Proteomics* 6, 18–28.

Patel, A., Sharma, P.V.N., Kumar, P., Binu, V. (2018): Sociocultural determinants of infertility stress in patients undergoing fertility treatments. *Journal of Human Reproductive Sciences* 11, 172.

Pepe, M.S., Feng, Z., Janes, H., Bossuyt, P.M., Potter, J.D. (2008): Pivotal Evaluation of the Accuracy of a Biomarker Used for Classification or Prediction: Standards for Study Design.

Journal of the National Cancer Institute 100, 1432–1438.

Pino, L.K., Rose, J., O’Broin, A., Shah, S., Schilling, B. (2020): Emerging mass spectrometry-based proteomics methodologies for novel biomedical applications. *Biochemical Society Transactions* 48, 1953–1966.

ProteinScape - Bruker Daltonics Inc. - PDF Catalogs | Technical Documentation [online] [navštíveno 1.1.2022] Dostupné z <https://pdf.medicalexpo.com/pdf/bruker-daltonics-inc/proteinscape/75820-143529.html>

Proteome Discoverer Software - CZ [online] [navštíveno 2.11.2021] Dostupné z [//www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-software/multi-omics-data-analysis/proteome-discoverer-software.html](http://www.thermofisher.com/uk/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-software/multi-omics-data-analysis/proteome-discoverer-software.html)

Rienzi, L., Cimadomo, D., Vaiarelli, A., Gennarelli, G., Holte, J., Livi, C., Aura Masip, M., Uher, P., Fabozzi, G., Ubaldi, F.M. (2021): Measuring success in IVF is a complex multidisciplinary task: time for a consensus? *Reproductive BioMedicine Online*.

Sadler, T.W. (2011): *Langmanova lékařská embryologie*. Grada, Praha.

Sanger, F., Tuppy, H. (1951): The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochemical Journal* 49, 463–481.

Sarkar, S., Gupta, P. (2016): Socio-Demographic Correlates of Women’s Infertility and Treatment Seeking Behavior in India. *Journal of Reproduction and Infertility* 17, 123–132.

Seymour, S.L., Hunter, C.L. (2015): *ProteinPilot™ Software Overview 2015*, 5.

Shi, F., Li, X., Ma, Z., Luan, T., Zhong, T., Gu, Y. (2021): Label-Free Quantitative Comparison of Cervical Mucus Peptides in Subjects With Endocervical Adenocarcinoma and Adenocarcinoma in Situ. *Technology in Cancer Research and Treatment* 20, 1533033821997825.

Silveira, C.O., Rezende, C.P., Ferreira, M.C., Del Puerto, H.L., Reis, F.M. (2017): Implantation Failure Is Associated With Increased α -Inhibin and β -Glycan Gene Expression in Secretory Phase Endometrium: Nested Case-Control Study of Infertile Women Undergoing IVF/Fresh Embryo Transfer. *Reproductive Sciences* 24, 720–725.

Sinha, A., Mann, M. (2020): A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics. *The Biochemist* 42, 64–69.

Sinha, A., Mann, M., 2020b. A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics. *The Biochemist* 42, 64–69. <https://doi.org/10.1042/BIO20200057>

Somigliana, E., Sarais, V., Reschini, M., Ferrari, S., Makieva, S., Cermisoni, G.C., Paffoni, A., Papaleo, E., Vigano, P. (2021): Single oral dose of vitamin D3 supplementation prior to in vitro fertilization and embryo transfer in normal weight women: the SUNDRO randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 225, 283.e1–283.e10.

Stages of Embryo Development [online] [navštíveno 29.9.2021] Reproductive Medicine Associates of New York. Dostupné z <https://www.rmany.com/blog/stages-of-embryo-development> (accessed 9.29.21).

Stephote, P.C., Edwards, R.G. (1978): Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* 312, 366.

Talevi, R., Gualtieri, R. (2004): In vivo versus in vitro fertilization. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 115, S68–S71.

Tang, L.-J., De Seta, F., Odreman, F., Venge, P., Piva, C., Guaschino, S., Garcia, R.C. (2007): Proteomic Analysis of Human Cervical-Vaginal Fluids. *Journal of Proteome Research* 6, 2874–2883.

The ESHRE Working Group on Ultrasound in ART, D'Angelo, A., Panayotidis, C., Amso, N., Marci, R., Matorras, R., Onofriescu, M., Turp, A.B., Vandekerckhove, F., Veleva, Z., Vermeulen, N., Vlasisavljevic, V. (2019): Recommendations for good practice in ultrasound: oocyte pick up. *Human Reproduction Open* 2019, hoz025.

Thomas, S.N. (2019): Mass spectrometry, in: *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 171–185.

Timeva, T., Shterev, A., Kyurkchiev, S. (2014): Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. *Journal of Reproduction and Infertility* 15, 173–183.

Timp, W., Timp, G. (2020): Beyond mass spectrometry, the next step in proteomics. *Science Advances* 6, eaax8978.

- Václavková, J., Ozdian, T., Hajdúch, M., Džubák, P. (2020): Body fluids as a source of prote-omic biomarkers of various diseases. *Chemicke Listy* 114, 209–215.
- Van Ostade, X., Dom, M., Tjalma, W., Van Raemdonck, G. (2018): Candidate biomarkers in the cervical vaginal fluid for the (self-)diagnosis of cervical precancer. *Archives of Gynecology Obstetrics* 297, 295–311.
- Van Steirteghem, A.C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., Wisanto, A., Devroey, P. (1993): High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 8, 1061–1066.
- Wang, J., Sauer, M.V. (2006): In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2, 355–364.
- Wang, M., You, J., Bemis, K.G., Tegeler, T.J., Brown, D.P.G. (2008): Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. *Briefings in Functional Genomics* 7, 329–339.
- Wiśniewski, J.R. (2016): Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Analytical Chemistry* 88, 5438–5443.
- Yanagimachi, R. (2016): M.C. Chang: A Pioneer of Mammalian In Vitro Fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 83, 846–849.
- Zaninovic, N., Irani, M., Meseguer, M. (2017): Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy? *Fertility and Sterility* 108, 722–729.
- Zhao, Y., Brezina, P., Hsu, C.-C., Garcia, J., Brinsden, P.R., Wallach, E. (2011): In vitro fertilization: Four decades of reflections and promises. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810, 843–852.
- Zubarev, R.A., Makarov, A. (2013): Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 85, 5288–5296.