

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Proteomika cervikálního hlenu

Dizertační práce

MUDr. Jan Vodička

Školitel: prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D.

Školící pracoviště: Porodnicko-gynekologická klinika, LF UP

Olomouc 2023

Prohlašuji, že jsem svou dizertační práci vypracoval samostatně s využitím citované literatury v závěru práce.

Olomouc 2023

MUDr. Jan Vodička

Poděkování patří mému školiteli, prof.MUDr.Radovanu Pilkovi,Ph.D. za odborné vedení, připomínky a cenné rady. Dále doc.MUDr.Jiřímu Dostálovi,Ph.D. za trpělivé konzultace a práci na databázi. Poděkování zaslouží i Mgr.Tomáš Oždian,Ph.D., který provedl pečlivě a zodpovědně analytickou část projektu.

Obsah

Seznam použitých zkratk

Souhrn

Summary

1.Úvod

2.Anatomická stavba dělohy

3.Embryonální vývoj dělohy

4.Histologie dělohy

4.1. Děloha jako svalová pumpa

5.Fyziologie

5.1.Endometriální cyklus

5.1.1.Hormonální regulace

5.1.2.Endometriální receptivita

6.Cervikální hlen

6.1.Biochemické složení cervikálního hlenu

6.2.Struktura cervikálního hlenu

6.3.Cyklické změny struktury cervikálního hlenu

6.4.Mechanismus a řízení sekrece cervikálního sekretu

6.5.Vlastnosti cervikálního hlenu

7.Proteom cervikálního sekretu

8.Cíle studie

9.Metodika

9.1.Kriteria pro výběr pacientek

9.2.Charakteristika pacientek

- 9.3.Odběr cervikálního hlenu
- 9.4.Ředění vzorku
- 9.5.Štěpení proteinů
- 9.6.Čištění peptidů
- 9.7.LC/MS analýza
- 9.8.Vyhledání bílkovin
 - 9.9.Metrika kontroly kvality
 - 9.10.Statistická analýza
 - 9.11.Bioinformatická analýza
- 10.Výsledky
 - 10.1.Kontrola kvality datové sady
 - 10.2.Proteomický charakter cervikálního hlenu
 - 10.3.Proteinová anotace identifikovaných proteinů
 - 10.4.Rozdílné proteiny ve skupinách IUI a IVF
- 11.Diskuse
- 12.Závěr
- 13.Seznam použité literatury
- 14.Publikační činnost autora
- 15.Přílohy

Seznam použitých zkratk

AFM	(atomic force microscopy)mikroskopie atomárních sil
ASA	(anti-sperm antibodies)protilátky proti spermiím
BMI	(body mass index)index tělesné hmotnosti
CIN	cervikální intraepiteliální neoplazie
CM	(cervical mucus)cervikální hlen
COH	(controlled ovarian hyperstimulation) řízená ovariální stimulace
DAVID	(database for annotation,visualization and integrated discovery)databáze pro anotace, vizualizaci a integrované vyhledávání
FASP	(filter aided sample preparation)příprava vzorku filtrací
FSH	folikulostimulující hormon
GnRh	(gonadotropin releasing hormon)hormon uvolňující gonadotropin
GO	genovýpůvod a funkce
GTP- asa	enzym ze skupiny hydroláz
IDCR	(ionic detergent compatibility reagent)čínidlo pro kompatibilitu iontových detergentů
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IUI	intrauterinní inseminace
IVF	(in vitro fertilizace)mimotělní oplození
LC/MS	(liquid chromatography/mass spectrometry)kapalinová chromatografie on line spojenás hmotnostním spektrometrem
LH	luteinizační hormon

MAR test	(mixed antiglobulin reaction) test navázaných spermatických protilátek
MED-FASP	(multi enzym digestion FASP) multienzymové štěpení
MET/EMT	(mesenchymal- epithelial transition, epithelial- mesenchymal transition) přeměna mesenchymo- epiteliální, epitelo- mesenchymální
MIP	(macrophage inflammatory protein) makrofágový zánětlivý protein
MMP	metaloproteinasa
MUC	mucin
NCS	(nucleolar channel systém) systém jaderných kanálků
NK	(natural killer) přirozený zabíječ
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCA	(principal component analysis) analýza hlavních komponent
RNA	ribonukleová kyselina
SELDI-TOF	(surface enhanced laser desorption ionization) laserová desorpce/ionizace s vylepšeným povrchem
SILAC	(stable isotope labeled amino acids in culture) značení pomocí aminokyselin se stabilními izotopy
SSC	spinocelulární karcinom
STAGE	stop and go extrakce
TFA	(trifluoroacetic acid) kyselina trifluoroctová
UA	urea

Souhrn

Disertační práce je zaměřená na možnosti využití nových poznatků o biomarkerech přítomných v sekretu hrdla děložního proteomickou analýzou. V cervikálním hlenu detekujeme produkty žláz endometria a žláz hrdla děložního. Cervikální hlen je dále obohacen o transudát tubárního původu a jsou přítomny i exprimované ovariální, peritoneální a proteiny svým původem vzdálených tkání. Proteom je definován jako soubor všech proteinů produkovaných buňkami určité tkáně za určitých podmínek v daném čase. Proteomika studuje přítomnost a množství proteinů, jejich interakci, modifikaci, funkci a místo vzniku. Stala se rychle se rozvíjející oblastí uplatňující se ve všech oblastech vědy. Dokáže stanovit sekvenci aminokyselin, molekulovou hmotnost, strukturu specifických vazeb a interakci s jinými látkami. Umožňuje tak lépe pochopit fyziologické i patologické procesy, které v tkáních probíhají.

V našem souboru jsme prokázali 4370 proteinů ve vzorcích cervikálního hlenu od 19 pacientek léčených pro neplodnost. Porovnali jsme rozdíly ve složení hlenu u žen ve spontánních léčebných cyklech a v cyklech s hormonální stimulací vaječnicků pro cyklus mimotělního oplození. Počet kvantifikovaných proteinů u žen ve spontánních cyklech byl 199 oproti 422 proteinům ve vzorcích s hormonální stimulací. Ve vzorcích jsme prokázali proteiny specifické pro preovulační a ovulační fázi cyklu. Biologická anotace proteomu cervikálního hlenu prokázala 57 % proteinů intracelulárního původu. Čtvrtinu všech proteinů tvořily imunoglobuliny.

Cervikální hlen je dobře dostupný, jeho odběr nepředstavuje pro ženu žádná rizika. Minimálně invazivní přístup v kombinaci s moderní technologií nabízí hledání nových diagnostických a léčebných postupů v gynekologii.

Summary

A proteome is defined as a set of all proteins produced under certain conditions in the real time. Proteomics show the spatiotemporal localization and quantity of proteins, their interactions, modifications and various modes of function. Proteomic analyses can uncover underlying amino acid sequences, molecular weight of individual proteins, their 3D structures or probable interactions with other substances. It allows a better understanding of ongoing physiological and pathological processes within tissues or organs.

This dissertation is focussed on the detection of novel biomarkers in cervical mucus by employing proteomics. Cervical mucus is rich in secretions from cervical and endometrial glands. It is further enriched by transudate from the fallopian tubes. Proteins from ovarian, peritoneal and remote tissues are also detectable.

We detected 4370 proteins in cervical mucus from 19 patients treated for infertility at our ART facility. Mucus composition was compared between women with spontaneous and hormonal stimulation cycles. 199 specific proteins were present in samples from spontaneous cycles compared to 422 proteins in hormone-stimulated cycles. Detected cervical mucus proteins were specific to the preovulatory and ovulatory phases of the cycle. Proteomic biological annotation revealed intracellular origin in 57% of mapped proteins. A quarter of all analyzed proteins belonged to the immunoglobulin family.

Easily accessible cervical mucus poses minimal risks for infertility patients as well as great diagnostic potential. In combination with the latest proteomic analytical approaches it offers the basis for exploring new diagnostic markers and therapeutics in gynecology.

1. Úvod

Cervikální hlen v užším slova smyslu je produktem sekretorických žláz žlázového epitelu děložního hrdla. Hrdlo děložní (cervix uteri) je kaudální část dělohy a představuje vstupní bránu vnitřního reprodukčního ústrojí ženy. Má řadu důležitých funkcí – zajišťuje bariéru mezi prostředím pochvy a vnitřním genitálním traktem, umožňuje průnik spermií a odtok nitroděložního sekretu nebo krve při menstruaci, chrání vyvíjející se plod v průběhu těhotenství a umožňuje vaginální porod [1].

2. Anatomická stavba dělohy

Děloha je vnitřní ženský dutý nepárový orgán uložený v malé pánvi. Slouží k uhnízdění a dalšímu vývoji lidského zárodku. Skládá se z těla (corpus) a hrdla (cervix) děložního spojeném v istmu děložním. Horní část těla dělohy mezi rohy děložními s odstupy párových vejcovodů se nazývá fundus děložní. Přední plocha dělohy se sklání k ventrokaudálně uloženému močovému měchýři, zadní plocha směřuje dorzokraniálně a je v kontaktu se středními kličkami. Obě plochy děložní v sebe přecházejí v děložních hranách. Děloha dospělé ženy má hruškovitý tvar a velikost přibližně 80x50x30 mm s hmotností okolo 80 g. Její stěnu tvoří tři vrstvy. Vnitřní sliznice (endometrium) obsahuje kromě stromatu značné množství žlázového epitelu. Střední vrstva dělohy je tvořena hladkou svalovinou (myometrium), zevní vrstva, která je tvořena pobřišnicí (perimetrium) propojuje tělo děložní s okolním vazivem a závěsným aparátem (parametrium). Istmus děložní je přechod mezi tělem a hrdlem děložním. Děloha se v istmu zužuje a přechází v hrdlo děložní. Dolnímu pólu tohoto zúžení odpovídá uvnitř dělohy ostium internum canalis cervicis uteri. Hrdlo děložní navazuje na dolní, zúženou část těla děložního. Na hrdlo děložní se upíná pochva. Úpon pochvy rozděluje část hrdla na supravaginální (horní úsek) a vaginální část hrdla dělohy (čípek). Vaginální část leží v dutině pochvy a volně se do ní otevírá mezi přední a zadní klenbou (fornix vaginae anterior et posterior). Na jeho zevním konci se nachází zevní ústí (ostium uteri externum), přes které dutina děložní komunikuje s pochvou (canalis cervicis uteri)[2].

Cévní zásobení dělohy je z děložních tepen (arteriae uterinae), která jsou větví arterie iliaca interna. Po odstupu z pánevní tepny jde děložní arterie na povrchu musculus levator ani mediálně směrem k děložnímu hrdlu. Asi 2 cm od hrdla se kříží s ureterem (tepna je kraniálně) a vysílá k němu drobnou arterii. Při stěně děložní se vine kraniálně mezi dvěma vrstvami širokého vazy k děložnímu rohu. Vydává větev pro vejcovod a vaječník. Vytváří anastomózu s tepnou vaječníku (arteria ovarica). Distálně vysílá děložní tepna větev pro děložní hrdlo a horní třetinu pochvy, poté vytváří anastomózu s poševní tepnou (arteria vaginalis) a s ní tvoří dvě podélné tepny, které běží před a za pochvou (arterie azygos vaginae). Krev z dělohy se sbírá do plexus venosus uterinus, který leží po stranách a podél horních úhlů dělohy mezi dvěma listy širokého vazy děložního a je spojen s plexus venosus vaginalis a plexus venosus ovaricus. Tyto žilní pleteně jsou odváděny do párových venae uterinae na obou stranách dělohy, které ústí do odpovídající vena iliaca interna.

Mízní cévy dělohy se skládají ze dvou skupin: povrchové a hluboké. Děložní hrdlo je drénováno třemi směry: 1) tranzverzálně do nodi lymphatici iliaci externi, 2) posterolaterálně do nodi lymphatici iliaci interni a 3) dorzálně do nodi lymphatici sacrales a podél ligamentum teres uteri do nodi lymphatici inguinales superficiales.

Inervace dělohy je zajištěna cestou sympatických a parasympatických nervových pletení. Sympatická z oblasti Th12-L2. Plexus uterovaginalis obsahuje vlákna dolní části parasympatiky z oblasti sakrálních ganglií S2 – S4 tvořících hypogastrický plexus. Nervy vstupují do dělohy po stranách v širokém vazu děložním spolu s děložními arteriemi [2,3].

3. Embryonální vývoj dělohy

Zpočátku mají embrya mužského i ženského pohlaví oba páry vývodných cest: mesonefrický (Wolfův) vývod a paramesonefrický (Müllerův) vývod. Kanál paramesonefrický vzniká jako podélná invaginace coelomového epitelu na předním povrchu urogenitální lišty. U plodů ženského pohlaví (karyotyp 46 XX) je pro vývoje určující absence mužských pohlavních hormonů. K diferenciaci Müllerových kanálků přispívají ženské pohlavní hormony. U děvčátek involvují všechny mesonefrické kanálky (jejichž zbytky někdy zůstávají jako paraoophoron a epoophoron) i ductus mesonefricus Wolfi (ze kterého mohou podél jeho průběhu persistovat Gartnerovy cysty). Z horních dvou třetin paramesonefrických duktů vzniká tuba uterina, kaudální třetina se spojuje s druhostranným vývodem a vytváří uterovaginální kanál, který se později diferenciuje v tělo a hrdlo děložní a část pochvy [4]. Paramesonefrické vývody jsou obsaženy v genitální liště, která se k sobě postupně oboustranně přibližuje, následně se spojí a vytvoří transversální řasu plica lata uteri. Tato řasa obsahuje mezenchym, který je základem pro vazivo ligamentum latum uteri a děložní svalovinu. V místě, kde se tkáň spojeného Müllerova vývodu dotkne stěny sinus urogenitalis, vzniká paramesonefrický (Müllerův) hrbolek, ztlustění entodermálního původu. Po stranách hrboleku se zakládají sinovaginální bulby, dva pupeny, které prolifерují, obrůstají hrbolek a vytvářejí vaginální ploténku. Buňky ploténky pokračují v proliferaci a prodlužují ji kraniálním směrem tak, že posouvají vzhůru i uterovaginální kanál. Ploténka i dno kanálu se postupem času luminizuje, kolem děložního krčku se lumen ještě rozšiřuje v poševní klenby, fornices vaginae. Vagina má tedy dvojí původ, horní úsek vzniká z canalis uterovaginalis z Müllerových vývodů, dolní úsek pak z buněk sinus urogenitalis. Oba úseky jsou od sebe do narození odděleny tenkou blánou, hymen, která se perinatálně perforuje, čímž vzniká ostium vaginae. Ke kompletnímu splynutí paramesonefrických vývodů dochází v 8. týdnu těhotenství. Ve 22. týdnu těhotenství je již dobře diferencované myometrium, endometrium se nadále vyvíjí. Neonatální endometriální lumenální epitelium je ploché a žlázový epitel je řídký. Vývoj žlázového epitelu je pomalý, teprve v pubertě žlázový epitel plně vyžívá [5].

4. Histologie dělohy

Děložní stěna je přibližně 1,5 – 2 cm silná a sestává se ze tří vrstev: 1) tunica mucosa (endometrium); 2) tunica muscularis (myometrium); 3) tunica serosa (perimetrium). Endometrium rozdělujeme na dvě části. První je funkční zóna (zona functionalis), která tvoří vnější část endometria. Tato vrstva se během menstruačního cyklu odlučuje. Druhá vrstva, nepodléhající degradaci, se nazývá basální zóna (zona basalis). Epitel děložní se skládá ze složky luminální a žlázové. Sekret žlázového epitelu je významný pro vznik, udržení a průběh těhotenství. Během posledních desetiletí se nashromáždily důkazy podporující jednoznačnou roli sekretů děložních žláz v komunikaci mezi endometriem a embryem, v implantaci a placentaci ovlivňující další průběh těhotenství. Poruchy vývoje nebo funkce děložních žláz mohou být příčinnými faktory infertility eventuelně těhotenských patologií (preeklampsie a retardace růstu plodu)[6]. Endometrium obsahuje řadu buněk a četnou síť retikulárních vláken. Endometrium se v průběhu dospívání mění. V průběhu pubertálního věku je endometrium tvořeno jednovrstevným kubickým epitelem. V období pohlavní zralosti dochází ke vzniku strukturálních a funkčních změn všech částí dělohy. Myometrium je nejsilnější vrstva děložní stěny, která má tloušťku asi 1,5 cm. Skládá se ze čtyř vrstev hladkých svalových buněk, které jsou prostoupeny vazivem. Dále je tvořeno krevními a lymfatickými cévami a autonomními nervy. Hladké svalové buňky dosahují délky okolo 50 μm u netěhotné dělohy. V graviditě se myometrium zmnožuje (hyperplazie) a prodlužuje (hypertrofie). Perimetrium se skládá z tenké vrstvy kolagenního vaziva, které je pokryto jednovrstevným plochým epitelem-mezotelem. Tunica serosa pokrývá celou zadní, přední a horní plochu dělohy. V místech, kde tunica serosa nepokrývá kolagenní vazivo při hranách dělohy, se nachází vazivová vrstva tunica adventicie neboli parametrium. Tato vrstva je tvořena z velkých cév a nervů a obsahuje četné parametriální vazy, které zahrnují svazky kolagenních vláken. Stavba stěny istmu děložního je oproti stěně těla odlišná pouze nepatrně. Ve stěně istmu se nachází menší množství hladkých svalových buněk spolu s fibroblasty. Endometrium je nižší a nepodléhá tak silným cyklickým změnám. V istmu dělohy existují dva typy žlázek – děložní a žlázy hrdla. Během těhotenství se stěna istmu ztenčuje, dochází k hyperplazii cirkulární hladké svaloviny a zároveň ubývá hladké svaloviny, která je orientována podélně vzhůru. Z istmu se během těhotenství stává dolní děložní segment. Epitel hrdla děložního vystylající endocervikální kanál a endocervikální krypty sestává z jedné vrstvy hlenotvorných cylindrických buněk. Jádra jsou při bazální membráně, ale při aktivní hlenové sekreci mohou být vytlačena směrem k lumen. Sekreční endocervikální buňky začínají na squamokolumnární junkci a vystylají endocervix a endocervikální krypty. Endocervikální žlázy jsou zanořené do stromatu cervixu, přes ústí komunikují přímo s cervikálním kanálem. Podle vzhledu a vnitřní struktury můžeme rozlišit bazální buňky, sekreční cylindrické buňky a cylindrické buňky s řasinkami. Ciliární buňky zajišťují výměnu iontů a hydrataci mucinu. Hlavní funkcí řasinkových buněk je aktivní přesun hlenu po sliznici. Některé studie předpokládají rozdílnou funkci žlázek podle lokalizace v cervixu – výše uložené žlázy produkují méně viskózní sekret, níže uložené produkují

sekret s vyšší viskozitou[7]. Pod epitelium je fibromuskulární vrstva s cirkulární orientací hladké svaloviny. Perimetrium tvoří třetí vrstvu pouze v supravaginální části hrdla děložního.

4.1. Děloha jako svalová pumpa

Děloha jako svalově kontrakční orgán není funkční pouze během těhotenství a porodu. Děložní kontrakce v podobě peristaltických vln byly popsány Kunzem v roce 1996. Existují tři hlavní směry peristaltické aktivity: A/ cervikofundální typ kontrakcí, B/ fundocervikální typ kontrakcí a C/ istmický typ kontrakcí. Kontrakce jsou umožněny architekturou muskulární vrstvy děložní stěny a převaha peristaltické aktivity je závislá na fázi menstruačního cyklu. Peristaltická aktivita myometria podléhá ovariální hormonální regulaci. Dysfunkce a hyperaktivita může být etiologickým faktorem vzniku pánevní endometriozy, adenomyozy a infertility [8].

V periovulační fázi napomáhá peristaltická aktivita transportu spermií od zevního cervikálního ústí kraniálně preferenčně k tubárnímu ostiu ipsilaterálně s ovariálním dominantním folikulem. Tento mechanismus se významně uplatňuje v lidské reprodukci. Během pozdní luteální fáze je v oblasti fundokornuální popisována snížená peristaltická aktivita s ohledem na předpokládanou embryonální implantaci.

Dysfunkční peristaltická aktivita je popisována u žen s endometriózou, adenomyosou, myomatosou a s nálezy endometriálních polypů. Ve svých důsledcích vedou k traumatizaci děložního endometria, narušují myometrální kontraktilitu a tím způsobují sníženou plodnost až infertilitu.

5. Fyziologie

5.1. Endometriální cyklus

Endometrium fertlní ženy prochází cyklickými změnami, které zahrnují fázi menstruace, proliferace a fázi sekrece. Během menstruace dochází po ischemizaci spirálních arteriol k odloučení funkční vrstvy endometria, které následně regeneruje z bazální vrstvy během proliferačního období. Fáze menstruace trvá 4-7 dnů. Tvorba cervikálního hľenu je v menstruaci potlačena. V proliferační fázi dochází k růstu epiteliálních buněk i děložních žláz. V této fázi jsou endometriální žlázy úzké, krátké a rovné. Ve střední a pozdní proliferační fázi cyklu se žlázy prodlužují a větví s maximem v období implantačního okna. Fáze proliferační trvá 10 dnů. Množství cervikálního hľenu se průběžně postupně zvyšuje a mění se i jeho vlastnosti. Změny kvality a množství cervikálního hľenu v průběhu menstruačního cyklu u žen popsali jako jedni z prvních v 50. letech minulého století Papanicolau a Rydberg [9,10].

V 70.tých letech minulého století popsal Insler možnosti využití cervikálního hlenu ke stanovení periovulačního období. Prokázal zvýšené množství viskóznějšího a tažnějšího hlenu u žen v periovulačním období, v souvislosti se zvýšeným množstvím estrogenů v této fázi cyklu. Využití je při časování a optimalizaci termínu doby početí [11]. Současně je v období estrogenního maxima cervikální hrdlo otevřeno a výše popsané změny umožňují vstup spermií do dělohy. Ve fázi sekreční, trvající 10-12 dnů, pak klesá množství cervikálního hlenu, zvyšuje se jeho hustota vlivem zvýšeného obsahu mucinu, v dutině děložní se mění charakter endometria, které se připravuje na implantaci embrya. Selhává-li uhnízdění embrya, žlázy regredují v pozdně sekreční fázi vlivem zániku ovariálního žlutého tělíska a rozpadnou se během menstruace [12].

5.1.1 Hormonální regulace

Endometriální cyklus je regulován hormonálně. Uplatňují se steroidní hormony především estrogeny a gestageny. Jsou lipofilní a v krvi jsou vázány na plazmatickou bílkovinu. Steroidní hormony se syntetizují z cholesterolu. Tato syntéza probíhá v endokrinních buňkách kůry nadledvin, ve folikulárních buňkách ovarií a v corpus luteum. Estrogen tvořený ovarií je 17β estradiol, v jiných tkáních je tvořen estron a během těhotenství se vylučuje estriol. Estrogeny mají proteoanabolický účinek, podílejí se zejména na tvorbě sekundárních pohlavních znaků, vývoji reprodukčních orgánů, proliferaci endometria dělohy, regulaci produkce hlenu děložním žlázovým epitelem a zvyšují ochranu před vaginální infekcí. Dále se podílí na regulaci menstruačního cyklu, tvorbě tuků, funkci mléčné žlázy, ukládání vápníku v kostech, zadržování vody v těle, zvyšují průtok krve vaječníky, ovlivňují zrání folikulu i vajíčka a mohou mít supresní vliv na emoční deprese. Progesteron vzniká z pregnenolonu. Progesteron je produkován ovariálním folikulem, žlutým tělískem, placentou, kůrou nadledvin. Progesteron má antiestrogenní a antigonadotropní účinek. Sekrece progesteronu je ovlivňována negativní zpětnou vazbou, snižuje hladinu LH a FSH. Zvyšuje bazální tělesnou teplotu ve druhé polovině ovulačního cyklu. Vlivem progesteronu dochází k transformaci proliferačního endometria, jeho úloha je klíčová pro úspěšnou implantaci a těhotenství. V těhotenství má relaxační vliv na myometrium. Mění charakter cervikálního hlenu. Tvorba steroidů je řízena gonadotropními hormony, mezi které řadíme LH a FSH. Gonadotropní hormony jsou syntetizovány předním lalokem hypofýzy a jejich vyplavení je regulováno hypotalamickým gonadoliberinem (GnRh). Regulace je zajištěna složitými zpětnovazebnými mechanismy mezi periferií a centrálním nervovým systémem. Gonadotropní hormony se vážají na thekální buňky ovaria pomocí vazebných receptorů a aktivují takzvaný buněčný systém. Dochází k přenosu cholesterolu do mitochondrií, kde proběhnou další metabolické pochody vedoucí k tvorbě steroidních hormonů [13].

5.1.2. Endometriální receptivita

Podmínkou úspěšné implantace embrya je řada interakcí mezi decidualizovaným endometriem a uvolněnou euploidní blastocystou. Endometrium prochází v průběhu cyklu fází regenerační, remodelační a diferenciační. Nezbytným faktorem těchto změn je vzájemná přeměna mezenchymálního a epiteliálního fenotypu endometriálních buněk. Proces je definován vlastností buněk změnit charakteristické znaky jednoho typu buněk na znaky typu druhého (mesenchymal – epithelial transition MET, epithelia – mesenchymal transition EMT)[14]. Při přeměně dochází k morfologickým změnám buněk – intracelulárně se zvyšuje glykogen, přibývá lipidů, expanduje endoplazmatické retikulum, mění se mikrofilamenta cytoskeletu, roste počet fagozomů a lyzozomů. Dochází ke specifické sekreci prolaktinu stimulujícího růst trofoblastu a jeho invazi, inhibuje sekreci prozánětlivých cytokinů. Zvyšuje se sekrece IGFBP-1 (insulin like growth hormon binding protein) regulující dělení buněk a stimulující invazi trofoblastu.

Při decidualizaci se zvyšuje intercelulární buněčná komunikace zvýšením exprese junkčních proteinů (beta katenin a E-kadherin). Molekulárně geneticky se při decidualizaci mění exprese více než 3000 genů. V recentních studiích byl sledován vliv miRNA na proces přeměny endometria v místě implantace. Změna exprese miRNA -429 reguluje geny pro kadherin – důležitou molekulu mezibuněčných vazeb. Do přeměny se zapojují také Ras proteiny – např. Rhoa, Rac regulující aktinový cytoskelet [15]. Strukturální změny myometria (myom, adenomyoza, jizvy po iatrogeních výkonech), endometriální polypy pak receptivitu negativně ovlivňují. Histopatologická transformace endometria během decidualních změn je dobře popsána, na molekulární úrovni jde o geneticky koordinované procesy kódované 39 geny rodiny homeobox (Hox) fungující jako transkripční faktory. Hox A10 a Hox A11 se zdají být nejdůležitější.

Během decidualizace jsou prokazatelné nárůsty prostaglandinů, vaskulárního endoteliálního růstového faktoru a imunitních buněk (makrofágy, přirození zabijáci – NK) indukujících produkci cytokinů (leukocytární inhibiční faktor a interleukiny). Na endometriu se zvyšuje exprese pinopodů a exprese molekul buněčné adheze. Pinopodie zvětšením povrchu buňky usnadňují adhezi embrya. Existuje přímá závislost mezi hladinami progesteronu, hustotou progesteronových receptorů a počtem pinopodií. Kromě pinopodií je dalším morfologickým markerem receptivity endometria nucleolar channel systém (NCS). Jde o systém několika vrstev cisteren a kanálek v buněčném jádře typickém v postovulačním endometriu. Má roli v otevírání implantačního okna a ve vyšší koncentraci je prokazatelná u plodných žen [16].

Proces decidualizace startuje explozí volných radikálů pomocí aktivace signální dráhy NADPH oxidázy (NOX4) se vzplanutím prozánětlivé odpovědi s vytvořením lokálního edému, zvýšením koncentrace

děložních přirozených zabíječů (uNK) a mesenchymální remodelací buněk [17]. Jednu z klíčových rolí v remodelaci endometria mají proteolytické enzymy – matrix metaloproteinázy (MMP) a jejich inhibitory. Podílejí se na regulaci růstu, proliferaci cév, apoptoze buněk. Stromální MMP 2 je jedním z nejdůležitějších pro architekturu endometria. Nezbytným pro implantaci je MMP 9, který se podílí na štěpení kolagenu [18]. U žen s výše jmenovanými děložními patologiemi byly prokázány změny exprese významných faktorů ovlivňujících transformaci endometria a tím i následnou implantaci [19,20].

6. Cervikální hlen

6.1. Biochemické složení

Cervikální sekret je glykoproteinový gel tvořený cervikálními žlázami. Cervikální hlen je složen z vody (90-98%) a četných organických a anorganických látek - muciny, polysacharidy, oligosacharidy, proteiny, lipidy, enzymy, organické kyseliny a ionty. Viskoelastické vlastnosti sekretu závisí na mucinech – hlavních strukturálních proteinech, což jsou velké glykosylované polymerní molekuly spojené disulfidickými vazbami. Na základě fyzikálních vlastností rozlišujeme muciny sekreční (vytvářejí strukturu sekretu) a membránové (chrání povrchové membrány epitelální buněk). V cervikální sekretu jsou přítomny především mucin2, mucin 5AC, mucin 5B a mucin 6. Vysoký obsah cysteinu umožňuje disulfidické vazby důležité pro vznik polymerů. Navázané oligosacharidy a polysacharidy ovlivňují biofyzikální vlastnosti sekretu, jeho stabilitu a odolnost proti bakteriálním enzymům[1].

6.2. Struktura cervikálního hlenu

Nové poznatky o struktuře cervikálního hlenu přinesla vyšetření pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a mikroskopie atomárních sil AFM (atomic force microscopy). Molekuly mucinu mají tvar filament, která se spojují vzájemně do paralelních svazků a sítí nebo mohou vytvářet globulární struktury. Ovlivňujícím faktorem je pH prostředí, ve kterém se nacházejí. Při hodnotě nižší, než je izoelektrický bod mucinu, vznikají filamenta a husté sítě, při hodnotě vyšší se vlákna rozvolňují a vznikají globulární struktury. AFM v první fázi cyklu prokázala hustější síť filament s otvory okolo 500 nm, bránící průniku spermií. V periovulačním hlenu je struktura odlišná – mucin tvoří disperzní agregované globule, což vysvětluje snížení viskozity. Kromě hodnoty pH reologické vlastnosti sekretu a jeho viskozitu ovlivňuje glykosylace mucinů, především řetězce kyseliny sialové (N-acetylneuraminové) a sacharidů se sulfátovými skupinami. Náboje na těchto skupinách stabilizují konfiguraci mucinů a ovlivňují viskozitu sekretu. Podrobná analýza proteomu ovulačního cervikálního sekretu prokázala převahu neutrálních oligosacharidů,

mimo ovulaci převažovaly acidické oligosacharidy. To souvisí s poznatkem, že snížení pH zvyšuje viskozitu cervikálního sekretu. Makromolekuly mucinů jsou štěpeny řadou enzymů – proteáz, sialidáz, glykosidáz a sulfatáz, což mění jejich fyzikální vlastnosti. Tyto enzymy tak mohou měnit nejen viskozitu, ale také interakci se spermii nebo bakteriemi. Dekondenzace mucinů zvýšením koncentrace HCO_3^- usnadní enzymatické štěpení vzájemné vazby NH_2 a COOH a změnu jejich konformace. Bylo prokázáno, že aktivita sialidázy dosahuje maxima v době ovulace [1].

6.3. Cyklické změny struktury cervikálního hlenu

V průběhu menstruačního cyklu se mění množství, fyzikální (reologické) vlastnosti a biochemická struktura v závislosti na hormonálních hladinách. V endocervixu převažují mucin 5B a mucin 4. Bylo prokázáno, že v období ovulace se množství mucinu 5B zvyšuje sedminásobně v porovnání s obdobím mimo ovulaci a dramaticky klesá při vzestupu progesteronu. V průběhu cyklu se kromě zastoupení jednotlivých mucinů v cervikálním sekretu také mění pH, obsah vody, glykosylace a další biofyzikální vlastnosti (tab. 1) [1,21].

Tab. 1. Změny cervikálního sekretu v průběhu menstruačního cyklu

Cervikální sekret	Ovulační fáze	Neovulační fáze
objem	vysoký	nízký
pH	alkalické	acidické
viskoelastičita	nízká	vysoká
obsah MUCB5, MUC4	vysoký	nízký
hydratace	vysoká	nízká
agregace mucinu	globulární	fibrózní
AFM obraz	disperzní globulární	denzní filamentózní síť
krystalizace NaCl	anizotropická	izotropická
Glykosylace	neutrální oligosacharidy	kyselé oligosacharidy
Kationty	zvýšení K^+	zvýšení Ca^{2+}
aktivita sialidázy	zvýšená	snížená
bariérová funkce	nízká	vysoká

6.4. Mechanismus a řízení sekrece cervikálního sekretu

Biosyntéza mucinů probíhá v Golgiho aparátu a endoplazmatickém retikulu. Molekuly mucinů jsou komprimované a uloženy v sekrečních granulích, které tvoří větší část mukózních buněk a nacházejí se také v jejich okolí v podobě vezikul. Po uvolnění z granulí nebo vezikul se kondenzované molekuly mucinů rozvíjejí. Na tom se podílí jednak náboje ionizovaných řetězců, jednak hydratace. V granulích převažuje koncentrace kalciových kationtů, které kompenzují negativní náboje na mucinu. Při sekreci přes otevřené kanály ve stěně jsou ionty Ca^{2+} vytěsňovány Na^+ . Dochází ke zvýšení osmotického tlaku, což vede ke vstupu molekul vody a bobtnání mucinů. Tento proces urychluje sekrece HCO_3^- a štěpení intramolekulárních vazeb enzymy. Množství a vlastnosti mucinů cervikálního sekretu závisí na hladinách ovariálních steroidů. Mechanismy jejich působení můžeme rozdělit na pomalé (v řádech hodin) a rychlé (v řádech sekund). K pomalým patří exprese genů pro muciny, jejich syntéza, glykosylace a sekrece. K rychlým patří regulace pohybu iontů a vody při transformaci a hydrataci makromolekul mucinů [21].

6.5. Vlastnosti cervikálního sekretu

6.5.1. Ochranná funkce cervikálního hlenu proti infekcím

Na ochraně proti průniku patogenů se podílí mimo fyzikálně-chemických vlastností sekretu také imunitní systém, jehož buňky jsou přítomny ve sliznici cervixu a patří k vrozené i získané imunitě. Reagují na hormonální podněty a uvolňují mediátory, které řídí migraci imunitních buněk. V časných fázích infekce imunitní buňky cervixu produkují velké množství cytokinů působících proti pronikajícím patogenům. K nejprobádanějším patří interleukiny (IL-1b, IL-1a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, macrophage inflammatory protein (MIP-1a), granulocyte colony-stimulation factor a tumor necrosis factor. Nejvyšší koncentrace měly IL-1, IL-6 a IL-8. V cervixu jsou přítomny bohatě zastoupené plazmatické buňky vytvářející IgA, IgG, IgM a některé složky komplementu. V průběhu ovulace se koncentrace imunoglobulinů v cervikálním sekretu snižuje [22].

6.5.2. Interakce cervikálního hlenu se spermii

Průnik spermii cervikálním sekretem je ovlivněn optimální biochemickou a fyzikální strukturou a tolerancí imunitního systému děložního hrdla. Imunitní systém musí současně bránit průniku patogenů a tolerovat alogenní spermie, což vyžaduje jeho přesné nastavení. Při diagnostice infertility byly provedeny

studie jednotlivých faktorů imunitního systému, které mohou spermie narušit a poškodit. Antispermatozoidální protilátky (ASA anti-sperm antibodies) mohou být IgA nebo IgG. Je možné je prokazovat více metodami – MAR test (mixed anti-globulin reaction), mikroaglutinace spermií, imobilizace spermií, imunofluorescence. Přímou interakci spermií s cervikálním hlenem vyšetřujeme postkoitálním testem, Kremerovým testem (sperm-cervical mucus penetration test) a sperm-cervical mucus contact testem. ASA mohou poškozovat kapacitaci spermií, akrozomální reakci, fertilizaci oocytů nebo preimplantační embryo. Byly vyšetřovány také protilátky proti lamininu-1. Lamininy jsou multifunkční glykoproteiny, které se podílejí na důležitých biologických aktivitách membrán – adhezi, stabilizaci a tvarových změnách. Nebyly však prokázány významné souvislosti s reprodukčními potížemi [23]. Kromě protilátek se mohou v cervixu uplatňovat také NK (natural killer) buňky [24].

7. Proteom cervikálního sekretu

Proteom je definován jako soubor všech proteinů produkovaných buňkami určité tkáně za určitých podmínek v daném čase. Proteomika studuje přítomnost a množství proteinů, jejich interakci, modifikaci, funkci a místo vzniku. Stala se rychle se rozvíjející oblastí uplatňující se ve všech oblastech vědy. Dokáže stanovit sekvenci aminokyselin, molekulovou hmotnost, strukturu specifických vazeb a interakci s jinými látkami. Umožňuje tak lépe pochopit fyziologické i patologické procesy, které ve tkáních probíhají. Do cervikálního sekretu se dostávají látky produkované ve vyšších etážích reprodukčního ústrojí, především endometriem nebo těhotenstvím. Nové možnosti diagnostiky reprodukčních patologií přináší v současnosti vyšetření proteomu cervikálního sekretu.

Studie Grandeho (2015) zkoumala složení proteinů hlenu hrdla děložního u 5 žen napříč menstruačním cyklem. Ve vzorcích proliferací fáze cyklu našla 59 proteinů, v periovulačním období 81 proteinů a v sekreční fázi 43 proteinů. 38 proteinů se objevovalo ve všech fázích menstruačního cyklu [25]. Studie Andersch –Bjorkmana(2007) a kolektivu hodnotí u 12 žen proteom cervikálního hlenu v průběhu cyklu. Významné změny ve složení hlenu se ukázaly pouze během ovulace, mimo ovulaci byly změny minimální. Identifikováno bylo 194 proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS/MS). Hlavním mucinem v hlenu s nejvyšším obsahem periovulačně byl mucin 5B. Nejvýraznějším rozdílem byl posun v mucinové glykosylaci. Glykosylace hlenu při ovulaci pravděpodobně usnadňuje pronikání spermií hlenem hrdla děložního. Z proteinů byla prokázána řada buněčných, sérových a specifických proteinů. Limitací může být kontaminace vzorků epiteliálními buňkami a krví spojených s odběrem metodou kartáčkem [26]. Studie Dasariho a kolektivu (2007) analyzovala a srovnávala proteom cervikovaginálního hlenu, séra a plodové vody u těhotných žen. Celkem bylo identifikováno 150 proteinů. Srovnání proteomů cervikovaginálního hlenu, séra a plodové vody ukázalo, že 77 proteinů je jedinečných pro hlen, dalších 56 a

17 proteinů obsažených v hlenu se vyskytuje také v séru a plodové vodě [27]. Další studii u těhotných provedla holandská skupina doktorky Hein s kolektivem (2005). Zaměřili se na složení a antimikrobiální aktivitu hlenových zátek těhotných žen před porodem. Semikvantitativní western blotting extraktů ukázal, že inhibitor sekreční leukoproteázy, lysozym, laktoferin a neutrofilní defensiny byly přítomny v koncentracích, které byly dostatečné pro antimikrobiální aktivitu [28]. Recentní práce Lacroix a kolektivu (2020) posuzuje cervikovaginální hlen a jeho složení jako obrannou bariéru bránící přestupu infekce ascendentní cestou u těhotných žen. Abnormality složení hlenové zátky spolu s bakteriální vaginózou významně přispívají k intraamniálním infekcím a předčasným porodům [29]. Pro neinvazivní detekci intraamniální infekce a riziko předčasného porodu je možné využít stanovení dominantní bakterie v cervikální tekutině [30]. Recentní práce Grandeho z roku 2017 porovnává proteomické spektrum cervikálního hlenu metodou hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením u 10 žen s laparoskopicky prokázanou endometriózou (histologicky verifikovanou) a srovnávací skupinou 10 zdravých žen fertilního věku. Detekovali skupiny diferencovaně exprimovaných proteinů, včetně některých funkčně významných proteinů. Šest proteinů bylo u endometriozy kvantitativně zvýšeno, téměř všechny se podílely na zvýšené zánětlivé odpovědi. Devět proteinů bylo u endometriozy kvantitativně sníženo, včetně některých proteinů souvisejících s vrozenou lokální imunitou (CRISP-3 a Pglyrp1) a ochranou proti oxidativnímu stresu (HSPB1). Některé proteiny související s antimikrobiální aktivitou nebyly proti kontrole detekovány u endometriozy. Dle závěrů studie se projevuje toto chronické onemocnění cervikálním hlenem zánětlivým proteinovým vzorem [31]. Studie Rocconioho z roku 2022 sleduje změny proteomu cervikovaginální tekutiny u 33 žen s ovariálním karcinomem a porovnává s kohortou 50 zdravých žen. Přítomnost pěti signálních peptidů (apolipoprotein A1, thymosin β 4like protein, serine proteinase inhibitor A1, periplakin, profilin 1) má prokazatelně vyšší pravděpodobnost detekce ovariálního karcinomu [32]. Jiná studie autorů Kawie a kolektivu (2018) analyzovala změny mikroRNA cervikálního hlenu jako možnosti využití diagnostického markeru u cervikálních neoplazií. Změny mikroRNA (miRNA) hrají roli v regulaci genové exprese během cervikální karcinogeneze. Cervikální hlen byl odebrán 230 pacientům s normálním děložním čípkem, cervikální intraepiteliální neoplazií (CIN), spinocelulárním karcinomem (SCC) nebo adenokarcinomem (AD). Studie identifikovala čtyři specifické miRNA (miR-126-3p, -20b-5p, 451a a -144-3p) v cervikálním hleně jako slibné biomarkery pro detekci rakoviny děložního čípku, zejména AD a vyšších stadií CIN [33]. Další využití znalostí proteomické mapy cervikálního hlenu se nabízí v asistované reprodukci při optimalizaci přípravy endometria pro implantaci embrya v *in vitro* fertilizaci. V recentních pracích se prokázaly rozdíly v proteomickém složení ve skupinách infertilních a implantačně selhávajících pacientek. V rámci tzv. epiteliálního receptomu bylo identifikováno 2048 proteinů, z nich 137 charakteristických pro receptivní a 134 pro nereceptivní endometrium [34,35].

8. Cíle studie

Tato studie se zaměřuje na proteomickou charakterizaci cervikálního hlenu s cílem vyhodnotit jeho složení jako neinvazivně získaný zdroj potenciálního biomarkeru různých patologií v ženském genitálním traktu. Prvním cílem této práce bylo optimalizovat experimentální pracovní postup pro získávání a zpracování cervikálního hlenu. Druhým pak posoudit rozdíly v proteomickém složení cervikálního hlenu u žen podstupujících intrauterinní inseminaci (IUI) během přirozených ovulačních cyklů a u žen podstupujících in vitro fertilizaci (IVF) s kontrolovanou ovariální stimulací.

9. Materiál a metody

9.1. Kritéria pro výběr pacientek

Návrh studie „Biomarkery endometriální receptivity (BIOMER, NCT04619524)“ byl schválen Etickou komisí LF UP a FN Olomouc. Pacientky v centru asistované reprodukce Fakultní nemocnice Olomouc byly posouzeny z hlediska způsobilosti a zařazeny do studie. Kritéria pro zařazení byla podepsání informovaného souhlasu, diagnóza neplodnosti mužského nebo idiopatického faktoru a plán otěhotnění ve spontánním ovulačním cyklu s intrauterinní inseminací nebo v cyklu s řízenou ovariální stimulací pro mimotělní oplození s použitím rekombinantního folikuly stimulujícího hormonu (rFSH) v kombinaci s agonistou eventuelně antagonistou gonadotropin uvolňujícího hormonu (GnRH) [36,37].

9.2. Charakteristika pacientek

Do studie bylo zařazeno 19 pacientek podstupujících léčbu neplodnosti v centru asistované reprodukce Fakultní nemocnice v Olomouci. Ve skupině podstupujících intrauterinní inseminaci (IUI) to bylo 10 žen, ve skupině léčených metodou mimotělního oplození (IVF) 9 žen. Průměrný věk pacientek byl 32,1 roků, ve skupině IUI 33,8 oproti 30,2 ve skupině IVF. Index tělesné hmotnosti BMI byl celkově 25,1 kg/m², ve skupině IUI 25,7 kg/m², ve skupině IVF 24,5 kg/m². Pro stanovení ovariální rezervy jsme změřili hladiny antimüllerian hormonu (AMH) a folikulostimulačního hormonu (FSH) v časně proliferální fázi cyklu. AMH byl celkově 3,8 ng/ml, v IUI skupině 3,5 ng/ml, v IVF skupině 4,2 ng/ml. FSH celkově 5,7 IU/l, v IUI skupině 6,9 IU/l, v IVF skupině 4,8 IU/l. Délka neplodnosti byla u všech pacientek v průměru 3 roky s mírnou odchylkou v obou skupinách. U 11 pacientek se jednalo o primární sterilitu, 8 pacientek již bylo v minulosti těhotných. V IVF skupině byly těhotné jen 2 pacientky oproti 6 pacientkám ve skupině IUI. Kuřaček bylo v souboru 21 %, více zastoupeny byly ve skupině IUI 30 % proti 11 % v IVF skupině. Výška endometria v době odběru cervikálního hlenu byla v průměru 9,4 mm, ve skupině IUI 8,6 mm ve skupině IVF 10,3 mm. Klinické charakteristiky účastníků studie jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2. Pacientky ve skupině IUI podstupovaly intrauterinní inseminaci bez hormonální stimulace, zatímco pacientky ve skupině IVF podstupovaly *in vitro* fertilizaci ve stimulovaných cyklech.

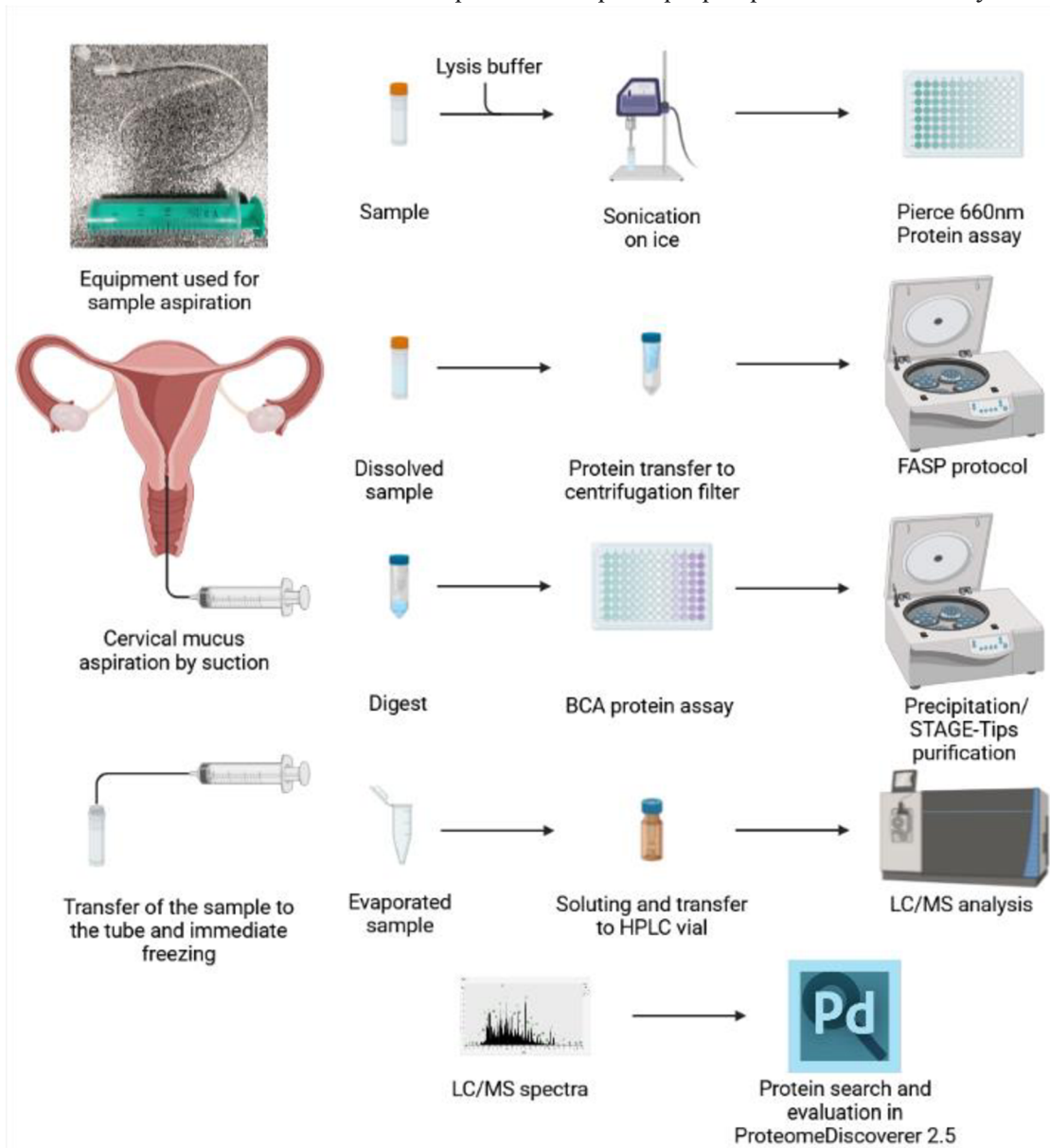
parametry	celkový soubor	IUI skupina	IVF skupina
Počet pacientek	19	10	9
Věk (roky)	32,1 (25-43)	33,8 (26-43)	30,2 (25-36)
BMI (kg/m ²)	25,1 (19-46)	25,7 (19-46)	24,5 (20-33)
AMH (ng/ml)	3,8 (0,8-8,6)	3,5 (0,8-6,8)	4,2 (2,0-8,6)
FSH (IU/l)	5,7 (2,7-10,9)	6,9 (2,7-10,9)	4,8 (4,1-6,5)
Délka neplodnosti (roky)	3,0 (0-7)	3,25 (1-6)	2,6 (0-7)
Kouření (%)	21	30	11
Výška endometria (mm)	9,4 (6-15)	8,6 (6-15)	10,3 (8-14)
Předchozí gravidita	8	6	2
Předchozí potrat	0	0	0
Počet získaných oocytů	12,9 (3-23)	Neuplatňuje se	12,9 (3-23)

9.3. Odběr hlenu

Ve skupině IUI byl ovulační cyklus pacientky monitorován ultrazvukem a IUI byla prováděna v periovulačním období. Odběr cervikálního hlenu byl proveden aspirací bezprostředně před IUI procedurou s použitím CP-01 neonatální pupeční kanyly (Gama Group, katalogové č. V646958-ND) připojené k injekční stříkačce. Vzorky byly poté přeneseny do zkumavek se šroubovacím uzávěrem (SSIbio, katalogové č. 2320-00), ihned zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při -80°C až do analýzy.

Ve skupině IVF pacientky podstoupily řízenou ovariální hyperstimulaci (COH) pro IVF/ICSI/ET; 4 pacientky byly stimulovány pomocí dlouhého protokolu s agonisty GnRH [36] a 5 pacientek pomocí protokolu s antagonisty GnRH [37]. Stimulace byla ukončena aplikací 7500 IU choriového gonadotropinu při dosažení 17-20 mm průměrné velikosti dominantních folikulů celé kohorty. Aspirace oocytů byla provedena o 36 hodin později transvaginálně pod sonografickou kontrolou v krátkodobé celkové anestezii. Odběr cervikálního hlenu byl proveden těsně před odběrem oocytů stejným postupem jako ve skupině IUI. Údaje o pacientech byly sbírány do elektronických formulářů kazuistik (ClinData; dostupné na clindata.imtm.cz).

Obrázek 1. Schematické znázornění pracovního postupu pro proteomickou analýzu cervikálního hlenu



9.4. Ředění vzorku

Vzorky byly rozpuštěny ve 100 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 4 % SDS, pH 7,6 (v textu označovaném jako FASP pufr)[30] a sonikovány pomocí jehlového sonikátoru Sonopuls GM mini 20 (Bandelin, Německo) 1 minutu pomocí sekvence 1 s pulz/1 s pauza s amplitudou 50 % a energií 378 J na 1 ml. Obsah proteinu v sonikovaných vzorcích byl poté analyzován metodou Pierce 660 nm [38] (Thermo Fisher, katalogové č. 22660) s přidáním reagentie pro kompatibilitu s iontovými detergenty (IDCR, Thermo Fisher, katalogové č. 22663) v souladu s instrukcemi výrobce.

9.5. Štěpení bílkovin

Vzorky pro proteomickou analýzu byly podrobeny přípravě vzorků na filtru (FASP) dle Wisniewského [39]. Ve stručnosti, každý vzorek byl zředěn v lyzačním pufru FASP, přenesen do filtrační

jednotky (Millipore, katalogové č. MRCF0R030), smíchan s pufrům UA (0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 8 M močovina) a odstředěn. Pokud není uvedeno jinak, centrifugace byla vždy prováděna po dobu 15 minut při 13 000 g a pokojové teplotě. Přidání UA pufru a odpovídající krok centrifugace byly jednou opakovány. Po promytí byly vzorky alkylovány přidávkem 0,05 M jodacetamidu s mícháním po dobu 1 minuty a poté ponechány ve tmě po dobu 20 minut. Vzorky byly poté odstředěny, filtrát byl odstraněn a vzorky byly promyty dvakrát UA pufrům a dvakrát 0,05 M hydrogenuhličitanem amonným (AmBiC). Štěpení bylo prováděno za použití směsi Trypsin/Lys-C (Promega, katalogové č. V5073) v 0,05 M AmBiC po dobu 18 hodin při 37 °C ve vodní lázni. Po štěpení byl digest centrifugován po dobu 10 minut při 13 000 g a dvakrát promyt 0,05 M AmBiC, přičemž po každém promytí následovala centrifugace při 13 000 g po dobu 10 minut. Trávicí enzymy byly použity v poměru 1:100 k proteinové nanášce. Nakonec byla stanovena koncentrace peptidu každého štěpení pomocí metody BCA.

9.6. Čištění peptidů

Deset mikrogramů peptidů bylo purifikováno pomocí dvoukrokového protokolu. Nejprve byl ke vzorku peptidu přidán 1 ml ledového acetonu, následovalo vortexování (20 sekund), 10 minut inkubace při pokojové teplotě a 10 minut centrifugace při 7000 g. Po odstředění byl supernatant odstraněn a vysrážené peptidy schnuly po dobu 1 hodiny. Suchý vzorek byl poté rozpuštěn v 0,05 M AmBiC a purifikován pomocí technologie STAGE Tips [40] se sorbentem styren-divinylbenzen-sulfonát s reverzní fází (SDB-RPS). Špička o objemu 200 ul byla opatřena třemi vrstvami extrakčních disků Sigma SDB-RPS s pevnou fází (katalogové č. 66886-U) a špička byla protlačena proraženým uzávěrem 2ml Eppendorfovy zkumavky. Sorbent v sestavené sadě byl aktivován acetonitrilem a vzorky byly smíchány s 1% TFA ve vodě a poté s 1% TFA v ethylacetátu. Směs vzorku byla poté vložena do špičky a centrifugována po dobu 3 minut při 2000 g, načež byla protékající kapalina odstraněna. Špička se vzorkem byla poté promyta 1% TFA v ethylacetátu a následně 0,2% TFA ve vodě a proteklý roztok byl po každém promytí zlikvidován. Nakonec, po přenesení do nové zkumavky, byly peptidy eluovány použitím 80% acetonitrilu s 1% amoniakem. Eluované vzorky byly odstředovány při 2000 g po dobu 3 minut, poté byly vakuově vysušeny a rozpuštěny v 1% acetonitrilu s 0,05% kyselinou trifluoroctovou před analýzou LC/MS.

9.7. LC/MS analýza

Jeden mikrogram naštěpených peptidů byl nastříknut a separován pomocí kapalinového chromatografu Dionex Ulti-Mate 3000 (Thermo Scientific, Německo) a poté podroben analýze na hmotnostním spektrometru Thermo Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific, Německo) vybaveném iontovým zdrojem Easy – Spray (Thermo Scientific, Malajsie). Separační protokol HPLC sestával z odsolovací kolony Acclaim PrepMap 100 (100 μm x 2 cm, C18, 5 μm, 100 Å; Thermo Scientific, Litva) s

následnou analytickou separací na koloně PepMap RSLC (75 μm x 25 cm, C18, 2 μm , 100 Å; Thermo Scientific, Litva). Nanášení vzorku a odsolování bylo prováděno za použití loadovací pumpy HPLC při průtoku 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 1% acetonitrilu s 0,05% kyselinou trifluoroctovou. Deset minut po nastříknutí byl přepnut ventil autosampleru a separace byla provedena pomocí nanopumpy při průtoku 300 nl/min do 95. minuty s gradientem stoupajícím od 2 % do 35 % mobilní fáze B. Mobilní fáze použité pro separaci byly 0,1% kyselina mravenčí ve vodě (A) a 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (B). Po 95. minutě byla kolona ekvilibrována 10 minut 95 % B a ekvilibrována 2 % B až do 125. minuty, kdy analýza skončila.

Thermo Orbitrap Exploris 480 byl nastaven na použití metody TopSpeed s MS akvizicí v orbitrapu s rozlišením 120 000 a hmotnostním rozsahem 400-1 500. Fragmentace byla provedena na orbitrapu s rozlišením 15 000 pomocí HCD (“Higher energy C-trap dissociation”) a 2s časovým rámcem pro fragmentaci mezi jednotlivými MS skeny. Kvalita měření byla monitorována vzorky digestu z hovězího sérového albuminu. Kontrolní vzorky byly nastříkovány a analyzovány před a po každé šarži experimentálních vzorků a také v intervalech deseti vzorků během analýzy šarže.

9.8. Vyhledávání proteinů

Zpracování získaných dat a vyhledávání proteinů bylo provedeno pomocí Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher Scientific). Z hrubých dat byly extrahovány seznamy píků a následně rekalibrovány proti lidské databázi Uniprot (www.uniprot.org) s úplnou digescí trypsinem a karbamidomethylací cysteinu jako statickou modifikací. Seznamy píků byly vytvořeny pomocí Spectrum Selector s výběrem prekurzoru v rozsahu 400-5000 Da, spodním prahem intenzity 2000 a hmotnostním analyzátozem FTMS. Hlavní vyhledávání bylo provedeno pomocí SequestHT proti lidské databázi UniProt. Byla povolena maximálně 2 chybějící štěpení a minimální a maximální délka peptidů byla nastavena na 6 a na 144 aminokyselin. Tolerance hmotnosti prekurzoru a fragmentu byly nastaveny na 5 ppm a 0,3 Da. Jako dynamické modifikace byly vybrány oxidace methioninu, *N*-terminální acetylce a karbamidomethylace cysteinu. Vyhledávání byla validována pomocí Percolatoru [41] se strategií Concatenated tar-get/decoy. Maximální hodnota delta Cn byla nastavena na 0,05 a cílové FDR byly 0,01 a 0,05 pro přísná a uvolněná kritéria. Chromatografické vlastnosti jednotlivých peptidů byly extrahovány pomocí nástroje Minora Feature Detection.

Konsenzuální pracovní postup („Consensus workflow“) začal extrakcí identifikovaných a kvantifikovaných peptidů z jednotlivých souborů. Pro zarovnání retenčního času byl použit Feature Mapper s maximálním posunem okna 10 minut a minimálním poměrem signálu k šumu. Kvantifikátor prekurzorových iontů byl použit k výpočtu label free kvantifikace z unikátních peptidů. Kvantifikace prekurzoru byla založena na intenzitě iontů. Kvantita proteinu byla určena na základě metody Top 3 Average. Normalizace byla vypočtena pomocí metody celkového průměrného množství peptidu. Druhá větev konsenzuálního pracovního postupu extrahovala data ze souborů a zaměřila se na validaci peptidů a proteinů. Prvním uzlem

v této větvi byl PSM Grouper s prahem pravděpodobnosti místa 95. Následující validátor peptidů používal automatický validační režim s přísnou cílovou FDR 0,01 a uvolněnou cílovou FDR 0,05 pro PSM (“Peptide spectrum matches”) i peptidy. Validované peptidy byly zpracovány pomocí filtru peptidů a proteinů se spolehlivostí peptidu nastavenou na alespoň vysokou a minimální délkou peptidu 6 aminokyselin. Proteinové filtry byly nastaveny na minimální počet 2 peptidových sekvencí, přičemž se počítaly pouze peptidy první úrovně. Filtrované proteiny a peptidy byly poté zpracovány ve třech větvích. První větev vedla k Protein Scorer, dělený na Protein FDR validator (nastavený pro Strict FDR 0,01 a uvolněnou FDR 0,05) a Protein Grouping pomocí funkce Apply Strict Parsimony. Druhá větev vedla k uzlu Protein Annotation, nastavenému pro anotaci biologických procesů, buněčných komponent a molekulárních funkcí pomocí stejné databáze jako vyhledávání proteinů. Poslední větev vedla do uzlu proteinového markeru. Všechna data generovaná v této práci lze získat prostřednictvím ProteomeXchange pomocí identifikátoru PXD037654.

9.9. Metriky kontroly kvality

Analýza kontroly kvality (QC) měření byla zpracována pomocí Skyline 21.2 (MacCoss Laboratories; skyline.ms) [42] s použitím sekvence hovězího sérového albuminu získané z databáze Uniprot. Pro kontrolní vzorky vytvořeny zprávy o kontrole kvality obsahující nejlepší retenční čas, celkovou plochu MS1, maximální výšku píku, maximální FWHM (šířka píku v polovině maxima výšky) a průměrnou hmotnostní chybu v ppm. Stabilita analytického systému byla hodnocena pomocí dvojité nabitého peptidu YICDNQDTISSK. Kritériem pro přijatelnost kvality byla variabilita retenčního času, FWHM a relativní směrodatná odchylka celkové plochy MS1 pod 15 %, běžně používané v LC-MS praxi. Pro průměrnou hmotnostní chybu jsme interně nastavili limit 3 ppm.

9.10. Statistická analýza

Počáteční statistické analýzy byly provedeny v Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher Scientific) a Excel 2016 (Microsoft Corporation). Seznam identifikovaných proteinů a peptidů byl exportován do Excelu a identifikované peptidy a proteiny byly extrahovány do jednoho datového souboru obsahujícího pouze peptidy identifikované s vysokou spolehlivostí a proteiny hodnocené jako Master. Počty peptidů a proteinů byly poté zprůměrovány přes soubory představující tři technické replikáty, aby se získala jedna hodnota na biologický vzorek. Výsledné průměrné hodnoty a standardní odchylky byly zaznamenány do sloupcového grafu. ProteomeDiscoverer 2.5 byl použit k provedení analýzy hlavních komponent (PCA) a generování teplotních map na základě normalizovaných intenzit proteinů. Parametry použité pro výpočet teplotní mapy byly Scale before clustering, Squared Euclidean distances a Complete linkage method.

Pro každý vzorek a protein/peptid byla četnost vypočítána jako hodnota \log_2 mediánu hodnot získaných pro tři technická opakování z Proteome Discoverer nebo v případě neimputovaných četností jako střední hodnota

chybějících hodnot. Protein/peptid byl považován za detekovaný ve vzorku, pokud jeho množství bylo kvantifikováno alespoň v jednom technickém replikátu tohoto vzorku.

Další statistické analýzy byly provedeny pomocí R, ver. 3.5.2. Statistická významnost rozdílů v množství a detekcích každého proteinu/peptidu mezi studijními skupinami byla hodnocena pomocí Wilcoxonova exaktního testu a Fisherova exaktního testu. Za statisticky významnou byla považována p-hodnota pod 0,05.

9.11. Bioinformatická analýza

Bioinformatická analýza se skládala z několika kroků. První krok zahrnoval stanovení biologického procesu, buněčné lokalizace a molekulární funkce identifikovaných proteinů. Tyto proteinové anotace byly provedeny pomocí ProteomeDiscoverer 2.5 v uzlu Protein annotation v konsenzuálním pracovním postupu a byly vizualizovány pomocí stejného programu.

Další anotace proteinových funkcí byla provedena pomocí webového rozhraní Metascape (metascape.org) [43] pomocí výchozího nastavení ("Express analysis"). Protein-proteinová interakce byla vypočtena pomocí webového rozhraní String [44]. Profily tkáňové exprese pro proteiny s Wilcoxonovým skóre pod 0,05 byly získány z databáze Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org)[45].

10. Výsledky

Proteomická analýza vzorků cervikálního hlenu odhalila 4370 proteinů zapojených do biologických procesů včetně degranulace neutrofilů, buněčných stresových reakcí a hemostázy. Diferenciální expresní analýza odhalila 199 proteinů přítomných zvýšeně ve vzorcích IUI a 422 proteinů ve vzorcích IVF. Proteiny z IUI cyklů se podílely na syntéze kyseliny fosfaditové, reakcích na vnější podněty a degranulaci neutrofilů, zatímco proteiny ve vzorcích z IVF byly spojeny s degranulací neutrofilů, s tvorbou zrohovatěného obalu a hemostázou. Následné analýzy objasnily proteinové složení cervikálního hlenu a jeho změny v souvislosti s hormonální stimulací dělohy.

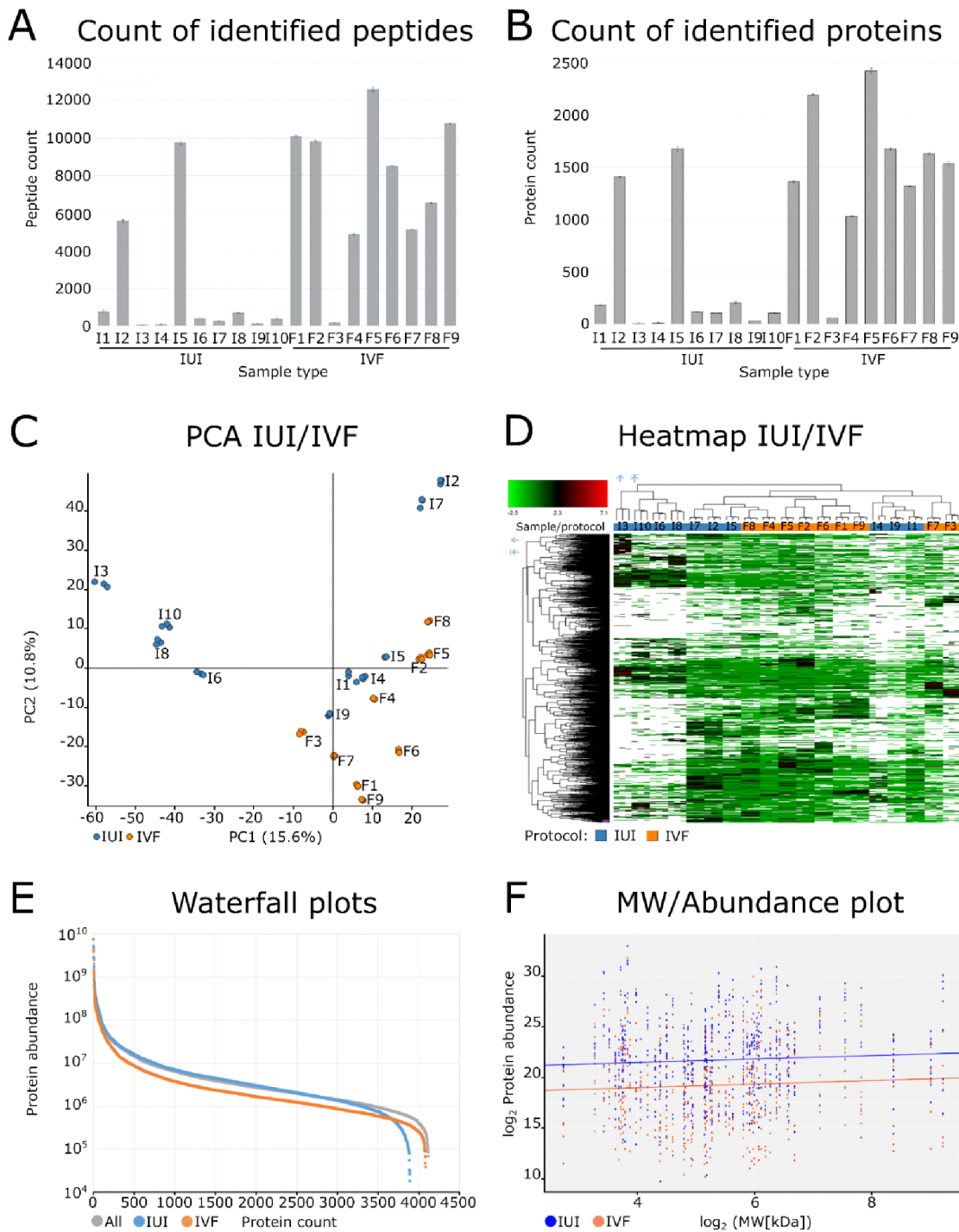
10.1. Kontrola kvality datové sady

LC-MS analýzy všech vzorků zkoumaných v této studii byly provedeny v jedné dávce. Stabilita analýz byla vyhodnocena retrospektivně s použitím dvojité nabitého peptidu YICDNQDTISSK jako referenčního analytu. Tento peptid měl retenční čas $29,22 \pm 0,32$ minut (1 % RSD), s FWHM $0,13 \pm 0,007$ minut (5,5 % RSD), maximální výšku píku $6,19 \times 10^8 \pm 4,11 \times 10^7$ (6,6 % RSD) a průměrná hmotnostní

chyba $0,57 \pm 0,57$ ppm. Všechny tyto hodnoty jsou pod mezní hodnotou 15 % RSD běžně používanou v analýzách LC-MS a chyba hmotnosti peptidu byla pod mezní hodnotou 3 ppm používanou interně v našem zařízení.

10.2. Proteomická charakterizace cervikálního hlenu

Při konečném hledání bylo ve všech 19 vzorcích společně pomocí ProteomeDiscoverer 2.5 identifikováno celkem 4370 proteinů (tabulka S1), 34166 peptidů a 470013 shod peptidového spektra. Počty identifikovaných peptidů a proteinů se mezi skupinami IUI a IVF významně lišily (obrázek 1 A, B). U skupiny IUI byl průměrný počet proteinů identifikovaných s vysokou spolehlivostí 97 ± 70 na vzorek (341 ± 260 peptidů). Existovaly však dva odlehlé vzorky (I2 a I5), ve kterých bylo identifikováno 1538 proteinů a 7668 peptidů. Naopak průměrný počet proteinů identifikovaných s vysokou spolehlivostí ve skupině IVF byl 1640 ± 428 na vzorek (8543 ± 2613 peptidů). Tato skupina měla jediný odlehlý vzorek (F3), ve kterém bylo identifikováno 60 proteinů a 163 peptidů.



Obrázek 2. Proteomická charakterizace analyzovaných vzorků. Graf (A) ukazuje počty peptidů identifikovaných v každém vzorku (jeden sloupec odpovídá průměru tří technických replikátů ± standardní odchylka). Graf (B) ukazuje počty proteinů v každém vzorku (jeden sloupec odpovídá průměru tří technických replikátů ± standardní odchylka). Graf PCA (C) a teplotní mapa (D) ilustrují globální rozdíly mezi vzorky. Graf PCA je centrován a škálován. Parametry teplotní mapy byly upraveny před shlukováním a výpočtem druhé mocniny euklidovských vzdáleností. Vodopádový graf (E) ukazuje distribuci normalizovaného množství proteinů. Graf MW/abundance (F) ukazuje normalizované množství proteinů a molekulové hmotnosti 63 proteinů, které byly identifikovány ve všech vzorcích a replikátech ve skupinách IUI a IVF, v daném pořadí. Výsledky kvantifikace proteinu byly vizualizovány pomocí PCA skóre (obrázek

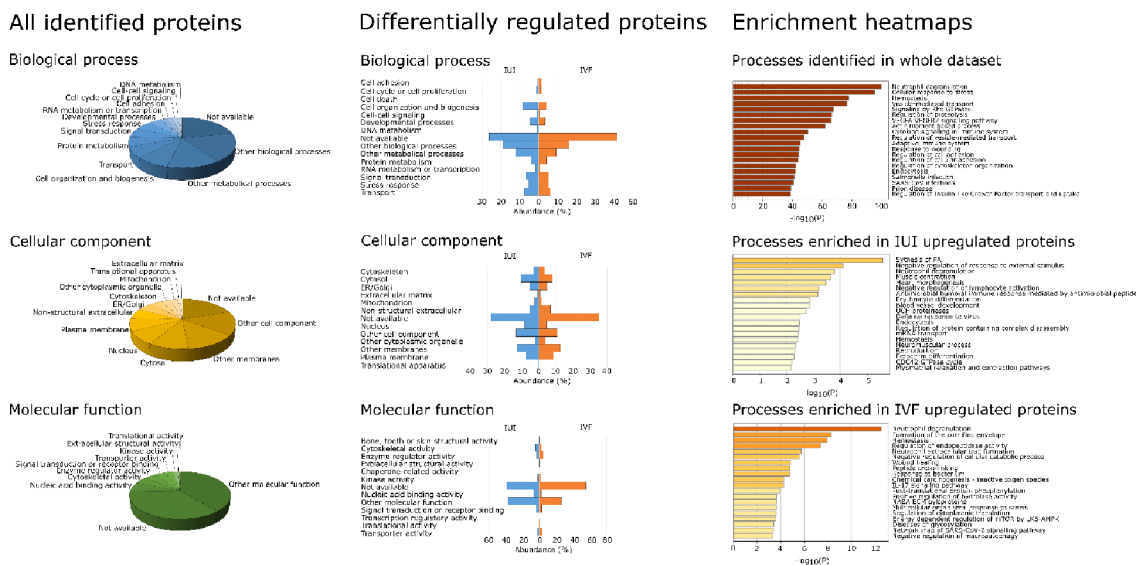
2C) a teplotní mapy (obrázek 2D). Graf PCA a teplotní mapa neodhalily žádné jasné trendy ve složení cervikálního hlenu; první a druhá hlavní složka PCA vysvětlily pouze 15,6 % a 10,8 % rozptylu v datech. Teplotní mapa měla dva hlavní shluky, jeden obsahující pouze vzorky IUI a jeden obsahující vzorky z obou skupin. To naznačuje, že účinky hormonální stimulace na složení cervikálního hlenu jsou převáženy odchylkami způsobenými jinými faktory.

Detektor funkcí Minora [46] se ukázal jako velmi užitečný při kvantitativní analýze proteomických dat cervikálního hlenu. Tento uzel ProteomeDiscoverer provádí identifikaci peptidů na základě tandemových hmotnostních spekter tím, že spojuje píky ve spektru jednoho vzorku s odpovídajícími retenčními časy a hmotnostmi původního peptidu v jiných vzorcích, čímž účinně snižuje počet chybějících hodnot ve výsledcích. Při aplikaci na náš soubor dat zvýšil počet kvantifikovaných proteinů ve vzorcích s nedostatečnou identifikací (tj. pouze asi 200 proteinů identifikovaných s vysokým skóre). Počty proteinů identifikované v kvantitativní analýze převyšovaly počty původně identifikované ve vzorcích, jak je vidět na vodopádovém grafu znázorněném na obrázku 2E. Kromě toho byla normalizovaná abundance proteinů ve skupině IUI jasně vyšší než ve skupině IVF a obecném proteomu. I když tedy vzorky IUI obsahovaly méně různých proteinů než vzorky IVF, proteiny, které byly přítomny, byly hojnější. Nízký počet proteinů ve skupině IUI by mohl být způsoben relativním obohacením proteinů s nižší molekulovou hmotností ve vzorcích IVF. Abychom tuto hypotézu otestovali, zaměřili jsme se na 63 proteinů, které byly kvantifikovány ve všech replikátech všech vzorků, a vypočítali jsme korelaci mezi jejich MW a jejich naměřenou abundancí (obrázek 2F). To však neodhalilo žádné významné rozdíly mezi skupinami IUI a IVF.

Po použití společných kritérií pro identifikaci obohacených proteinů (\log_2 násobná změna alespoň 1 a p-hodnota pod 0,05) jsme identifikovali 199 a 422 proteinů, které byly obohaceny ve vzorcích IUI a IVF. Je zajímavé, že tato čísla jsou vyšší než průměrné počty identifikovaných proteinů ve vzorcích IUI. Zkoumali jsme proto neimputované datové soubory kvantifikovaných proteinů ve skupinách proteinů obohacených IUI a IVF. Zjištění, že ve vzorcích IUI bylo identifikováno méně proteinů, bylo podpořeno výsledky pro proteiny obohacené IVF, z nichž 214 bylo specifických pro skupinu IVF. Dalších 34 proteinů bylo přítomno pouze ve skupině IVF a pozitivní odlehlé vzorky I2 a I5 ze skupiny IUI, zatímco zbývající proteiny obohacené IVF byly identifikovány v obou skupinách. Intenzity proteinů obohacených IUI byly distribuovány homogenně napříč vzorky.

10.3. Proteinová anotace identifikovaných proteinů

Analyza proteinové anotace byla provedena v ProteomeDiscoverer a Metascape (obrázek 3). Když vezmeme v úvahu úplný soubor proteinů identifikovaných ve všech vzorcích (představujících obecný proteom cervikálního hltu), nejčastějšími anotacemi biologických procesů byly jiné biologické (18 %) a jiné metabolické (13 %) procesy, následované organizací buněk (8 %), transportem (7 %), metabolismem bílkovin (6 %) a přenosem signálu (6 %). Nejčastější anotáci buněčné složky byly ostatní buněčné složky (15 %), jiné membrány (13 %) a cytosol (10 %), dále jaderné (8 %), plazmatická membrána (8 %), nestrukturální extracelulární (6 %) a ER/Golgi (5 %). Nejčastější anotáci molekulární funkce byla jiná molekulární funkce (39 %), následovaná vazebnou aktivitou nukleových kyselin (6 %), cytoskeletální aktivitou (4 %), aktivitou enzymového regulátoru (4 %) a signální transdukcí nebo vazbou na receptor (4 %). U přibližně 20 % proteinů nebyly získány žádné GO anotace.



Obrázek 3. Výsledky anotace proteinů pro proteom cervikálního hltu. Anotace pro tři hlavní kategorie termínů GO – biologická funkce, buněčná složka a molekulární funkce – byly vytvořeny pomocí ProteomeDiscoverer pro kompletní proteom cervikálního hltu a pro soubory proteinů vykazujících rozdílnou expresi ve vzorcích IUI a IVF. Pro tyto tři proteinové soubory byly také získány další anotace založené na tepelné mapě obohacení Metascape [43].

Distribuce anotací pro soubor proteinů obohacených o IUI byla podobná jako u obecného proteomu cervikálního hltu ve všech třech hlavních větvích GO. Anotace biologických procesů vykazující nejvýraznější rozdíly ve frekvenci mezi souborem proteinů obohaceným o IUI a obecnými soubory proteinů nebyly žádné známé biologické procesy (+4,4 % v souboru obohaceném o IUI), jiné biologické procesy (+0,8 %), přenos signálu (+ 0,7 %), buněčná adheze (-1,4 %), další metabolické procesy (-1,3 %) a metabolismus bílkovin (-2,31 %). Frekvence všech ostatních anotací biologických procesů v souboru obohaceném o IUI byly srovnatelné s frekvencemi v obecném souboru. Jedinou anotací buněčné složky, jejíž

frekvence v souboru obohaceném o IUI se výrazně lišila od frekvence v obecném souboru, nebyla žádná známá buněčná složka (+8,3 % v souboru obohaceném o IUI); frekvence všech ostatních anotací buněčné složky se mezi těmito dvěma soubory lišily o <2 %. Jedinou anotací molekulární funkce, jejíž frekvence v souboru obohaceném o IUI se výrazně lišila od frekvence v obecném souboru, nebyla žádná známá molekulární funkce (+3,2 %); četností všech ostatních anotací se mezi těmito dvěma soubory lišily o <2 %. Anotace buněčných procesů, jejichž frekvence v sadě proteinů obohacených o IVF se podstatně lišily od četností v obecné sadě, nebyl žádný známý biologický proces (+20 % v sadě obohacené o IVF), organizace buněk (-4,5 %), vývojové procesy (-1,5 %), metabolismus DNA (-0,7 %), další biologické procesy (-2 %), ostatní metabolické procesy (-4,5 %), metabolismus bílkovin (-2 %), metabolismus RNA (-1,5 %) a transport (1 %). Jiné anotace buněčného procesu (např. buněčná adheze, buněčný cyklus, signalizace buňka-buňka, signální transdukce a stresová odezva) měly v těchto dvou souborech podobné frekvence. Podobné výsledky byly získány pro anotace buněčných komponent – anotace vykazující podstatné rozdíly ve frekvenci nebyly žádná známá buněčná složka (+16 % v sadě obohacené o IVF), cytoskelet (-1 %), cytosol (-2 %), ER/Golgiho (-1 %), mitochondrie (-1 %), jádro (-4 %), další buněčné složky (-5 %), další membrány (-1 %) a translace (-1 %). Zbývající anotace buněčných složek (plazmatická membrána, nestrukturální extracelulární, jiné cytoplazmatické organely a extracelulární matrix) měly v těchto dvou souborech podobné frekvence. Anotace molekulárních funkcí, jejichž frekvence se výrazně lišily mezi IVF a obecnými soubory, nebyly žádné známé molekulární funkce (+20 % v souboru IVF), cytoskeletální aktivita (-2,1 %), vazebná aktivita nukleové kyseliny (-4,2 %), jiné molekulární funkce (-12,6 %), signální transdukční aktivitu nebo receptorovou vazbu (-1,2 %) a transportní aktivitu (-0,8 %). Další anotace molekulárních funkcí (kostní, zubní nebo kožní strukturální aktivita, aktivita enzymového regulátoru, extracelulární strukturální aktivita, kinázová aktivita a translační aktivita) měly v těchto dvou souborech podobné frekvence. Vzhledem k vysokému počtu „jiných“ procesních anotací (které neusnadňují další analýzu) ve výsledcích ProteomeDiscovereru jsme k získání dalších anotací použili software Metascape. Tento algoritmus kombinuje funkční obohacení, interakčímovou analýzu, genovou anotaci a vyhledávání členství k využití více než 40 nezávislých znalostníchází v rámci jediného integrovaného portálu [43] a generuje výsledky, které lze vizualizovat ve formě tepelných map Enrichment (viz obrázek 3Á). Anotace přiřazené k obecným proteinům cervikálního hlenu v analýze Metascape zahrnovaly degranulaci neutrofilů, buněčnou odpověď na stres, hemostázu, vezikulami zprostředkovaný transport a signalizaci Rho GTPázami.

V souladu s výsledky pro obecný proteom cervikálního hlenu byla degranulace neutrofilů nejvýše hodnocenou anotací v teplotní mapě pro odlišně exprimované proteiny ve vzorcích IVF a hemostáza byla třetí nejvíce hodnocenou anotací. Pořadí hodnocení pro ostatní anotace sady IVF se však lišilo: druhou nejvíce hodnocenou anotací byla tvorba zrohovatěného obalu, čtvrtá byla regulace aktivity endopeptidázy a

pátou byla tvorba extracelulární pasti neutrofilů. Vysoký počet proteinů bez anotace lze vysvětlit tím, že 46 % všech odlišně regulovaných IVF proteinů byly imunoglobuliny.

Teplotní mapa obohacení také odhalila rozdíly mezi anotačními distribucemi proteinů obohacených IUI a kompletním proteomem cervikálního hlenu. Anotace vykazující největší obohacení v souboru IUI byla syntéza kyseliny fosfatidové, esenciálního prekurzoru fosfolipidů. Druhou nejbohatší anotací byla negativní regulace odpovědi na vnější podnět, následovaná procesy degranulace neutrofilů, svalovou kontrakcí a morfogenezí srdce.

Bohužel nebyly získány žádné anotace pro přibližně 20 % ze 4370 proteinů identifikovaných v úplném proteomu cervikálního hlenu. Bylo to způsobeno dvěma faktory. Za prvé, 1716 z těchto proteinů postrádalo genový symbol přiřazený databázi Uniprot. Za druhé, 1178 z nich bylo identifikováno jako imunoglobuliny (většinou variabilní oblasti). Pouze 34 Ig proteinů má genový symbol a pokud je nám známo, v současné době neexistuje dobrý nástroj pro biologickou interpretaci různých imunoglobulinových variant.

10.4. Rozdílné proteiny skupin IUI a IVF

Odděleně od biologické interpretace proteomických dat je otázka, které proteiny nejúčinněji rozlišují IUI od IVF, a tedy fyziologický versus hormonálně stimulovaný ovariální cyklus. K identifikaci takových diskriminačních proteinů jsme použili Wilcoxonův exaktní test a Fisherův test. To odhalilo, že 29 normalizovaných a imputovaných zdrojových proteinů bylo detekováno v alespoň dvou replikátech všech analyzovaných vzorků (tabulka 2), z nichž 14 bylo obohaceno o IUI a 15 v IVF. Čtyři proteiny byly tkáňově zesíleny v ženském reprodukčním traktu, zatímco některé další vykazovaly skupinově obohacenou tkáňovou expresi ve skupinách tkání, které zahrnovaly děložní čípek.

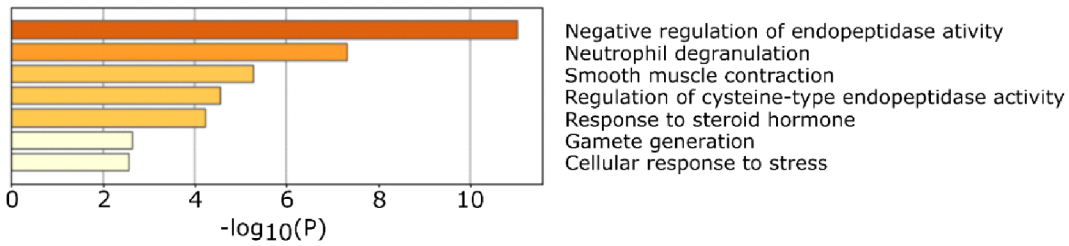
Tabulka 2. Seznam proteinů odlišujících IUI od kohort IVF. Tyto proteiny byly kvantifikovány v alespoň dvou replikátech všech vzorků a měly p-hodnoty Wilcoxonova testu pod 0,05. Intenzity proteinů ve sloupcích IUI a IVF jsou uvedeny jako mediány s minimálními a maximálními hodnotami log2-transformované agregované intenzity uvedenými v závorkách. Log2 násobné změny byly vypočteny na základě středních hodnot a jsou uvedeny jako poměry IUI/IVF. Údaje o tkáňové expresi jsou z atlasu lidských proteinů [20].

Protein	Uniprot ID	Gene symbol	IUI	IVF	Log 2 fold change	Wilcox test p-value	Tissue expression
WAP four-disulfide core domain protein 2	Q14508	WFDC2	22.23(21.61 - 23.18)	28.58(28.07 - 30.04)	-6.35	0.00009	Tissue enhanced (cervix, salivary gland)
Enoyl-CoA hydratase	H0YFD6	HADHA	27.4(26.34 - 28.32)	22.5(21.77 - 24.36)	4.9	0.00015	Tissue enhanced (skeletal muscle)
Dopamine receptor interacting protein 4	Q4W4Y1	DRIP4	24.65(23.99 - 29.22)	21.67(21.64 - 22.17)	2.98	0.00026	N/A
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Q99460	PSMD1	20.81(20.02 - 21.45)	23.23(22.66 - 23.39)	-2.42	0.00097	Low tissue specificity
Serpin family A member 3	A0A024R6P0	SERPINA3	23.81(22.91 - 24.6)	26.63(25.33 - 26.82)	-2.82	0.00097	Group enriched (liver, pancreas)
Connective tissue growth factor	Q5M8T4	CTGF	24.38(22.83 - 25.49)	20.38(20.24 - 20.76)	4	0.00145	N/A
Glucose-6-phosphate isomerase	P06744	GPI	24.68(23.75 - 31.52)	22.16(21.69 - 22.44)	2.52	0.00145	Low tissue specificity
Laminin subunit gamma-2	Q13753	LAMC2	25.02(23.24 - 25.35)	21.37(21.04 - 21.54)	3.65	0.00210	Tissue enhanced (urinary bladder)
Serpin family A member 5	P05154	SERPINA5	23.34(22.86 - 24.34)	26.11(24.62 - 26.71)	-2.77	0.00299	Tissue enhanced (adrenal gland, liver, testis)
Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	P42356	PI4KA	22.81(21.58 - 23.46)	20.85(20.43 - 21.29)	1.96	0.00299	Low tissue specificity
Antileukoproteinase	P03973	SLPI	29.09(28.37 - 30.85)	31.87(31.66 - 32.18)	-2.78	0.00567	Group enriched (cervix, salivary gland)
Stratifin	P31947	SFN	22.25(20.94 - 23)	24.7(23.61 - 25.3)	-2.45	0.00567	Group enriched (esophagus, skin, vagina)
Polymeric immunoglobulin receptor	P01833	PIGR	26.09(25.25 - 27.66)	29.5(28.89 - 29.86)	-3.41	0.00567	Tissue enhanced (intestine, salivary gland)
Midkine	P21741	MDK	21.56(21.19 - 23.06)	24.15(23.88 - 24.52)	-2.59	0.00762	Tissue enhanced (ovary)
Complement factor D	Q6FHW3	DF	22.67(21.52 - 23.63)	27.12(23.95 - 27.79)	-4.45	0.01013	N/A
Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	HSPA2	22.49(21.58 - 23.44)	20.81(20.43 - 21.49)	1.68	0.01013	Tissue enhanced (brain, skeletal muscle)
Elongation factor 1-gamma	P26641	EEF1G	25.04(23.62 - 25.65)	21.2(19.37 - 23.49)	3.84	0.01013	Low tissue specificity
FLJ00385 protein	Q8NF17	FLJ00385	28.94(26.87 - 29.81)	26.31(24.04 - 26.89)	2.63	0.01013	N/A
Cystatin C	A0A0K0K1J1	CSTS3	24.16(23.61 - 25.99)	28.73(27.02 - 28.83)	-4.57	0.01327	Tissue enhanced (brain)
Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3	A0A024RDH2	UBE2D3	24.12(23.36 - 25.01)	21.1(19.86 - 22.89)	3.02	0.01327	Low tissue specificity
Immunoglobulin delta heavy chain	P0DOX3	N/A	23.74(22.24 - 27)	21.19(20.28 - 21.82)	2.55	0.01327	N/A

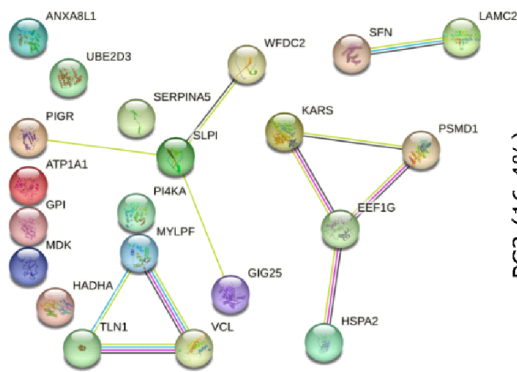
Lysine--tRNA ligase	Q15046	KARS1	21.5(20.19 - 22.1)	23.81(21.76 - 24.82)	-2.31	0.01721	Low tissue specificity
Talin-1	Q9Y490	TLN1	22.05(21.48 - 23.09)	23.87(22.72 - 24.8)	-1.82	0.02202	Low tissue specificity
Myosin regulatory light chain 11	Q96A32	MYL11	22.61(21 - 23.08)	20.21(19.59 - 21.23)	2.4	0.02202	Group enriched (skeletal muscle, tongue)
Dermcidin	P81605-2	DCD	24.36(22.79 - 27.5)	22.47(21.57 - 23.03)	1.89	0.02202	Tissue enriched (skin)
Annexin A8-like protein 1	Q5VT79	ANXA8L1	22.27(21.4 - 25.36)	20.01(19.56 - 21.26)	2.26	0.02793	Group enriched (esophagus, skin, vagina)
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	P05023	ATP1A1	22.94(22.24 - 23.32)	21.3(21.09 - 22.28)	1.64	0.03499	Tissue enhanced (parathyroid gland)
Vinculin	A0A024QZN4	VCL	22.02(21.77 - 22.82)	23.63(22.4 - 24.42)	-1.61	0.04347	Low tissue specificity
Keratin 13	A1A4E9	KRT13	24.18(23.3 - 24.74)	27.66(26.01 - 28.76)	-3.48	0.04347	Tissue enhanced (esophagus, vagina)

Z 29 proteinů uvedených v tabulce 2 bylo 23 rozpoznáno Metascape (obrázek 3). Osm bylo označeno pro negativní regulaci aktivity endopeptidázy (GO:0010951) s log₁₀ p-hodnotou -11,03, zatímco 7 bylo označeno pro zapojení do degranulace neutrofilů (R-HSA-6798695; log₁₀ p-hodnota -7,30). Žádná další anotace nebyla přiřazena více než čtyřem proteinům v této skupině. Mezi 29 proteiny byly identifikovány čtyři interakce protein-protein v analýze provedené pomocí platformy String. První interakce zahrnovala KARS, PSMD1, EEF1G a HSPA2, což jsou všechny faktory ovlivňující syntézu a degradaci proteinů. Druhý zahrnoval WFDC2, SLPI, GIG25 (SERPINA3) a PIGR, což jsou skupina sekretovaných inhibitorů proteináz a imunoglobulinového receptoru exprimovaného v buňkách slizničního epitelu; tyto proteiny byly obohaceny ve skupině IVF. Třetí zahrnoval MYLPF (MYL11), TLN1 a VCL, což jsou cytoskeletální proteiny podílející se na buněčné adhezi a svalové kontrakci. Finální interakce zahrnovala proteiny extracelulární matrix SFN a LAMC2.

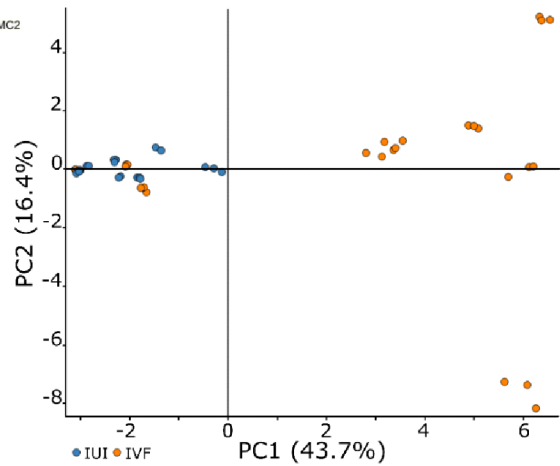
A Enrichment heatmap



B Protein-protein interaction



C PCA of differential proteins



Obrázek 3. Anotace proteinů s Wilcoxonovým skóre pod 0,05. Biologické anotace byly použity k vytvoření tepelné mapy obohacení pomocí Metascape (A) a ke zmapování interakcí protein-protein (B). PCA graf (C) ukazuje distribuci diferencovaně exprimovaných proteinů s Wilcoxonovými p-hodnotami pod 0,05 ve vzorcích IUI a IVF.

11. Diskuse

Tato studie není první proteomickou analýzou lidského cervikálního hlenu. Dřívější snahy v této oblasti publikované v roce 2007 však identifikovaly mnohem méně proteinů ve srovnání s naší studií (685, 194 a 147 ve studiích Shawa, Anderse-Björkmanna a Tanga) [26,47,48]. Panicker demonstroval alternativní přístup v roce 2009 pomocí SELDI-TOF k identifikaci 30 proteinových píků v průměru v hmotnostním rámci 2,5-30 kDa[49]. Nedávno Grande zkoumal proteomické změny v cervikálním hlenu během menstruačního cyklu [25] a změny v expresi proteinů spojené s endometriózou [31], což vedlo k identifikaci 81 a 140 proteinů. Ma navíc hledala proteinové biomarkery adenokarcinomu děložního čípku v hlenu děložního hrdla a identifikovala 711 proteinů [50]. Proteomické analýzy cervikálního hlenu byly rovněž prováděny v kontextu veterinární medicíny [51] a ve studiích na cervikální zátce během těhotenství [52]. Nejnovější výzkum v této oblasti v době přípravy rukopisu publikoval Leo Han, který ve srovnávací analýze cervikálního hlenu u lidí a makaků rhesus identifikoval 3048 proteinů [53]. Všechny tyto studie používaly různé přístupy k různým aspektům proteomické analýzy, a proto mají různé silné a slabé stránky ve srovnání s touto prací, jak diskutujeme níže.

11.1. Modelový systém pro hodnocení cervikálního hlenu

Předchozí analýzy cervikálního hlenu byly prováděny odběrem vzorků během spontánních cyklů, což znemožňovalo přesné stanovení doby, která uplynula mezi ovulací a odběrem; průměrná chyba byla přibližně jeden den. Vzorky odebrané v IUI v této práci měly podobnou úroveň přesnosti jako vzorky odrážející složení cervikálního hlenu během normálních ovulačních cyklů.

Náš modelový systém založený na IVF/ICSI/ET (skupina IVF) však napodoboval přirozené početí za standardizovaných podmínek, ale umožňoval odběr vzorků v rozmezí zhruba 15 minut kolem doby ovulace. Tato přesnost byla možná, protože vaječníky byly monitorovány ultrazvukem, načasování ovulace bylo řízeno aplikací exogenního hCG a vajíčka byla odebrána transvaginální punkcí. Vzorky cervikálního hlenu byly získány bezprostředně před odběrem vajíček.

11.2. Odběr cervikálního hlenu

V dřívějších studiích byly použity dva hlavní přístupy k odběru vzorků cervikálního hlenu. Prvním je odběr cervikovaginální tekutiny nebo výplach pochvy. Tento přístup použil Shaw [54], který analyzoval cervikovaginální tekutinu získanou vložením gázy do pochvy na 1 hodinu, a Tang [48], který provedl vaginální výplach 5 ml fyziologického roztoku. Oba přístupy jsou přímočaré a poskytují vzorky bez sloučenin, které mohou narušovat následné zpracování. Získaný proteom je však spíše vaginálního než cervikálního původu. Druhý přístup zahrnuje extrakci cervikálního hlenu odsátím tenkým katétrem a použili

jej Andersch-Björkman [26], Grande [25,31], Han [53] a naše skupina. Tento přístup umožňuje selektivní sběr cervikálního hlenu s minimální kontaminací z jiných kompartmentů genitourinárního traktu. Konečně, během pravidelných gynekologických vyšetření prováděných [55] k prevenci rakoviny děložního čípku se běžně odebírají vzorky cervikálního epitelu spolu s tekutinou/hlenem pomocí specializovaného kartáčku. Tento přístup použil Panicker [49], ale Andersch-Björkman [26] uvedl, že vede k poměrně silné kontaminaci vzorku epitelem a krevními buňkami.

11.3. Proteomické přístupy v analýze cervikálního hlenu

Viskozita cervikálního hlenu se mění s fází menstruačního cyklu, takže vzorky musí být rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle, aby se usnadnilo další zpracování. K tomuto účelu bylo použito několik přístupů. Rozpuštění je nejpřímější pro vzorky cervikovaginální tekutiny, kterou lze extrahovat z fosfátem pufovaného fyziologického roztoku a cervikovaginálnílaváže a přímo zpracovat. Oba materiály pak mohou být odstředěny a podrobeny následné přípravě vzorku. Náročnější je však zpracování cervikálního hlenu získaného odsáváním. Relativně šetrnou metodu rozpouštění popsal Grande[25,31], který použil 0,2% kyselinu trifluoroctovou s následnou centrifugací při 9200 g. Tento přístup nezavádí žádné sloučeniny, které by mohly interferovat s následnými proteinovými testy nebo štěpením, ale extrahuje pouze několik proteinů v počátečním vzorku, jak je ukázáno na poměrně malém počtu proteinů identifikovaných ve studiích, kde byl tento postup použit. Druhý přístup použili Andersch-Björkman[26], Han [53] a naše skupina. V našich experimentech byl použit 4 % SDS pufr. Andersch-Björkman a kol. obešli test koncentrace proteinu přímým nanesením rozpuštěného hlenu do elektroforetického gelu, zatímco Ma [50] et al. použili koncentrace detergentu podobné těm, které byly použity v naší práci v kombinaci s chaotropním činidlem (7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % SDS, 40 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA). Po tomto ošetření následovalo vysrážení acetonem, rozpuštění vysrážených proteinů v 8 M močovinně/100 mM tetraethyl-amonium bromidu (TEAB) a metabolické značení iTRAQ (které obešlo jakoukoli potřebu provádět test koncentrace proteinu). Bylo obtížné najít vhodnou metodu pro stanovení koncentrace proteinů kvůli přítomnosti interferenčních složek v pufru. Kvantitativní hmotnostní spektrometrie je nezbytná pro úspěšnou identifikaci biomarkerů, a přestože bylo navrženo mnoho izotopicky značených přístupů [56], považují kvantifikaci bez značení za vhodnější. Potřebovali jsme proto spolehlivě kontrolovat množství proteinů a peptidů obsažených ve vzorcích podrobených zpracování a hmotnostní spektrometrické analýze. Bohužel složení pufru FASP, který jsme použili k solubilizaci vzorků hlenu (4% SDS, 100 mM DTT), jej činí nekompatibilním s většinou kolorimetrických proteinových testů; BCA test toleruje detergenty, ale je citlivý na redukční činidla, zatímco opak je pravdou pro Bradfordův test. Nakonec jsme dosáhli přijatelných výsledků s proteinovým testem Thermo Scientific Pierce 660 nm s použitím činidla ICDR[57]. Abychom vyhodnotili účinnost následného kroku štěpení a vyladili množství peptidů injikovaných do systému LC-MS,

provedli jsme standardní test BCA před purifikací peptidu. Protože dřívější studie cervikálního hlenu používaly různé metody přípravy vzorků a techniky hmotnostní spektrometrie, používaly také různé strategie štěpení a purifikace peptidů. Panicker [49] použil SELDI-TOF, který vyžaduje strategii přípravy vzorku, která se výrazně liší od strategií potřebných pro proteomické analýzy zdola nahoru, jako jsou ty provedené v jiných citovaných studiích. Naopak Tang [48] použil 2-rozměrnou elektroforézu, Andersch-Björkman [26] a Shaw [47] použili frakcionaci SDS-PAGE s následnou gelovou skvrnou / excizí pásu a následným štěpením. Shaw dovedl tento přístup téměř k dokonalosti, když provedl řadu obecných proteomických experimentů a samostatných specializovaných experimentů zkoumajících muciny a jejich glykosylaci. Grande [25,31] a Ma [50] oba použili bezgelový přístup zahrnující přímé štěpení v roztoku. Bohužel však Ma poskytla jen omezené podrobnosti o tomto procesu; vysvětlení toho, jak byly tvrdé pufrы zředěny před štěpením trypsinem, bylo příliš strohé. Bylo publikováno, že štěpení trypsinem v roztokové fázi není optimální, pokud jde o účinnost a odstranění interferujících sloučenin. V důsledku toho byla vyvinuta řada alternativních přístupů, které umožňují efektivnější štěpení. Jedním z takových přístupů, který dosáhl značné popularity, je příprava vzorků pomocí filtru (FASP), kterou vyvinul Wisniewski [39]. Tento přístup jsme úspěšně použili v dřívějších studiích [58] a během počáteční fáze této práce. Následně jsme testovali optimalizaci FASP pomocí Lys-C endopeptidázy a zjistili jsme, že použití tohoto enzymu významně zvýšilo počet peptidů identifikovaných ve vzorcích v souladu s publikovanými nároky [59]. Podobný přístup zahrnující rozšířenou modifikaci FASP [60] použil Han [53]. Zatímco schopnosti těchto dvou metod nebyly ještě přímo porovnány, dostupná data naznačují, že obě fungují dobře.

11.4. Proteom cervikálního hlenu

Jak bylo uvedeno výše, předchozí studie o proteomice cervikálního hlenu identifikovaly 30 - 3048 proteinů u 3 - 29 pacientů. Zde uvádíme identifikaci 4370 proteinů ve vzorcích cervikálního hlenu od 19 pacientek podstupujících asistovanou reprodukci s (IVF) nebo bez (IUI) hormonální stimulace. Analýza úplného souboru vzorků představujících skupiny IUI i IVF poskytla několik zajímavých zjištění. Za prvé, v některých vzorcích, hlavně ze skupiny IUI, bylo s vysokou spolehlivostí identifikováno relativně málo proteinů. Další zkoumání ukázalo, že počet proteinů, které byly kvantifikovány na základě přesných údajů o hmotnosti a retenčním čase, přesáhl počet identifikovaný analýzou tandemových hmotnostních spekter. Nicméně počet kvantifikovaných proteinů ve vzorcích IUI byl konzistentně menší než ve vzorcích IVF. Protože množství proteinu vstříkovaného do hmotnostního spektrometru bylo v obou případech identické, existují dvě možná vysvětlení tohoto výsledku. První je, že v cervikálním hlenu žen bez hormonální stimulace bylo obsaženo méně, ale více exprimovaných proteinů než u žen podstupujících hormonální

stimulaci, které by mohly obsahovat některé proteiny, které byly exprimovány v důsledku léčby exogenními estrogeny. Alternativně se fyzikálně-chemické vlastnosti cervikálního hlenu od žen, které dostávají hormonální stimulaci, mohou lišit od vlastností žen, které takovou stimulaci nedostávají, kvůli rozdílům ve faktorech, jako je obsah vody nebo peptidoglykanová matrice. Takové rozdíly by mohly ovlivnit permeabilitu hlenu pro sekretované proteiny a tím jeho přednostní obohacení o proteiny s nižší molekulovou hmotností. Výsledky prezentované na obrázcích 2E a 2F však naznačují, že první hypotéza je pravděpodobnější. Kromě těchto rozdílů a identifikace některých proteinů běžně obohacených ve vzorcích IUI a IVF byly obě skupiny vzorků relativně podobné a vliv velikosti proteinů se neodrazil v relativním množství. To dokazují také výsledky teplotní mapy a PCA na obrázku 2.

Andersch-Björkmann [26] identifikoval 195 proteinů v cervikálním hlenu, z nichž 97 bylo také identifikováno v naší studii. Kromě toho bylo v našich vzorcích také detekováno 32 ze 148 proteinů identifikovaných Tangem[48]. Grande publikoval dvě studie o proteomice cervikálního hlenu. První studie porovnávala proteinové složení cervikálního hlenu v různých fázích menstruačního cyklu a identifikovala 109 proteinů, z nichž 26 bylo také identifikováno v našich vzorcích[25]. Druhá Grandeova studie se zaměřila na objevování endometriálních biomarkerů a identifikovala 110 proteinů, které jsme také identifikovali[31]. V této práci však bylo identifikováno dalších 4261 proteinů, ale ne v Grandeově studii a 94 proteinů bylo identifikováno Grandem, ale ne námi. Podobně, když porovnáme naše výsledky s výsledky Han [53], zjistíme, že 1040 proteinů bylo společných pro oba soubory dat, ale 3330 bylo nalezeno výhradně v našem souboru dat. Navzdory odlišnému postupu odběru vzorků, klinickým charakteristikám, přístrojovému vybavení a protokolům použitým ve všech těchto studiích, omezené překrývání mezi sadami identifikovaných proteinů (které existuje i při srovnání této práce se staršími studiiemi s malým počtem identifikací) naznačuje, že složení cervikálního hlenu je vysoce variabilní a pro budoucí diagnostické použití je nutná další standardizace. „Minimální“ proteom cervikálního hlenu sestávající pouze z proteinů identifikovaných v této práci a ve všech dřívějších studiích citovaných v tomto odstavci obsahuje pouze 9 proteinů: A1BG, ALB, ANXA1, APOA1, HP, LCN2, LYZ, PFN1 a S100A9.

Biologická anotace proteomu cervikálního hlenu odhalila, že 57 % proteinů identifikovaných v této práci mělo intracelulární GO anotaci (obrázek 3). Kromě toho 7 z 20 ontologických termínů zahrnutých v tepelné mapě obohacení pro cervikální hlen souvisí s intracelulárními procesy. To bylo zajímavé, protože některé zprávy popisují cervikální hlen v ovulační fázi jako bezbuněčnou slizniční tekutinu [61]. Naše data nemusí být nutně neslučitelná s tímto tvrzením, protože přítomnost intracelulárních proteinů není přímým důkazem přítomnosti buněk; místo toho by to mohlo indikovat přítomnost subcelulárních částic, exozomů nebo pouze proteinů uvolněných buněčným a epiteliálním obratem. Primární funkcí cervikálního hlenu je představovat fyzickou a imunitní bariéru pro průchod faktorů z mimoděložního prostředí do horní části

reprodukčního traktu, přičemž zůstává během ovulace semipermeabilní pro spermie. Zde prezentovaná analýza je v souladu s touto funkcí, protože teplotní mapa představuje 20 nejpravděpodobnějších procesů spojených s identifikovanými proteiny, obsahovala 4 termíny související s imunitou a bylo zjištěno, že nejpravděpodobnějším procesem je degranulace neutrofilů (R-HSA-6798695) zapojujících se do biologie cervikálního hlenu. Obrannou funkci cervikálního hlenu potvrdil i fakt, že 1178 ze 4370 proteinů identifikovaných v této práci byly imunoglobuliny a jejich fragmenty. To je v souladu s předchozími publikacemi [62-64].

11.5. Rozdíly mezi IUI a IVF

Dřívější studie srovnávající odpovědi IUI a IVF se zaměřovaly hlavně na analýzu výsledků těhotenství [65-67], hodnocení endometriálních odpovědí měřením tloušťky endometria [68] nebo zkoumání biologie endometria pomocí elektronové mikroskopie, histochemické analýzy biopsií endometria nebo necílené proteomické analýzy endometriální tekutiny [69-71]. Byly také provedeny studie o změnách cervikálního hlenu (vyhodnoceno pomocí Inslerova skóre) [11] vyvolaných hormonální hyperstimulací podobnou té, kterou obdržela naše skupina IVF [72]. Navíc četné studie prokázaly, že hormonální antikoncepce může způsobit změny ve vlastnostech cervikálního hlenu [73,74], opět na základě Inslerova skóre. Nicméně, pokud je nám známo, pouze dvě studie přímo zkoumaly hormonálně vyvolané změny v biologickém složení cervikálního hlenu: Andersch-Björkmann [26] a Grande [25] zkoumaly proteinové složení cervikálního hlenu během různých fází přirozeného menstruačního cyklu.

Andersch-Björkmann[26] identifikoval 195 proteinů, z nichž 97 bylo také identifikováno v naší studii. Jejich hlavní zájem spočíval v mucinech a změnách v jejich relativním množství během menstruačního cyklu, které způsobují downregulaci mucinů během období ovulace. Jejich výsledky ukázaly, že všechny muciny byly hojnější v cervikálním hlenu od žen podstupujících IVF, přičemž MUC5AC a MUC16 měly Wilxonovo skóre pod 0,05.

Grande [25] identifikoval 38 proteinů, které byly popsány jako konstitutivně exprimované ve všech fázích menstruačního cyklu. Dvacet pět těchto proteinů bylo také identifikováno v našich vzorcích a tři z nich měly p-hodnoty pod 0,05, což ukazuje na rozdílnou expresi; dva byly obohaceny ve vzorcích IVF (WFDC2 a SLPI) a jeden v IUI (IGHG1). Kromě toho bylo v našich ovulačních vzorcích detegováno 20 ze 42 proteinů, které Grande popsal jako specifické pro preovulační fázi. Dva proteiny z této skupiny (A2GL a DEFB1) byly obohaceny ve vzorcích IVF a jeden (EF1A1) byl obohacen ve skupině IUI. Je zajímavé, že v našich vzorcích bylo detekováno pouze 10 z 38 proteinů, které Grande popsal jako specifické pro ovulační fázi. Dva z těchto 10 proteinů, LOX12 a RBGP1, byly obohaceny ve skupině IVF. V postovulační fázi jsme

identifikovali 7 ze 17 proteinů, z nichž žádný nebyl obohacen ve skupinách IVF nebo IUI. Tyto výsledky ukazují, že vyšší míra identifikovaných proteinů nám umožnila detekovat proteiny dříve považované za fázově specifické v ovulačním cervikálním hlenu. Naše výsledky také odhalily významné rozdíly v obsahu proteinů v cervikálním hlenu od skupin pacientek IUI a IVF: bylo zjištěno, že 199 proteinů bylo obohaceno v IUI a 422 v IVF. Podle ProteomeDiscoverer byl hlavní ontologický termín spojený s proteiny obohacenými ve vzorcích IUI a také s proteiny obohacenými ve vzorcích IVF „necharakterizován“. Více informativních výsledků bylo získáno pomocí Metascape, který ukázal, že hlavními ontologickými termíny spojenými s proteiny obohacenými ve skupině IUI byly syntéza kyseliny fosfatidové, negativní regulace reakcí na vnější podněty, svalové kontrakce a morfogeneze srdce. Ontologické termíny spojené s proteiny obohacenými ve vzorcích IVF byly více podobné anotacím obecného proteomu, i když byly pozorovány určité rozdíly. Zejména skupina IVF byla spojena s tvorbou zrohovatěného obalu, aktivitou endopeptidázy a tvorbou extracelulární pasti neutrofilů. Kromě toho bylo 27 % identifikovaných proteinů upregulováno při srovnání skupin IUI a IVF, zatímco 46 % bylo regulováno směrem dolů, což naznačuje rozdíly v imunitních vlastnostech cervikálního hlenu za podmínek IUI a IVF. To je v souladu se skutečností, že je známo, že imunitní odpověď je v ženském genitálním traktu hormonálně regulována[75], a s naším zjištěním, že imunoglobuliny tvořily zhruba čtvrtinu proteinů identifikovaných v této práci. Užitečné poznatky o účincích IVF a hormonálních změnách obecněji na imunitní vlastnosti cervikálního hlenu by mohly být potenciálně získány srovnáním našich výsledků s výsledky dřívější studie, která měřila koncentrace interleukinů a cytokinů v endometriální tekutině u žen podstupujících IUI a IVF[76]. Přímé srovnání výsledků těchto dvou studií však může být obtížné, protože dřívější studie také ukázala, že hladiny interleukinů a cytokinů v endometriální tekutině se podstatně lišily od hladin v cervikálním hlenu.

12. Závěr

Naše studie definovala proteom cervikálního hlenu dosud nejkomplexnějším způsobem. Ověřili jsme cervikální hlen jako cenný neinvazivní zdroj potenciálních proteinových biomarkerů a prokázali význam klinických a laboratorních standardizačních procesů umožňujících reprodukovatelné měření a jeho budoucí využití v klinické diagnostice poruch ženského reprodukčního traktu.

13. Seznam použité literatury

1. Crha, K., Ventruba, P., Žáková, J. et al.: Cervical mucus and its role in reproduction, *Čes. Gynec.*, 2020, 85, 5, p333-338
2. Pilka, R. et al.: *Gynekologie*, 2022 Maxdorf 18-21
3. Pinsard, M., Mouchet, N., Dion, L. et al.: Anatomic and functional mapping of human uterine innervation, *Fertility and Sterility* Vol. 117, No. 6, June 2022, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.02.013>
4. Trávník, P.: *Klinická embryologie*, 2018 Mladá fronta
5. Sadler, T.W.: *Langmanova lékařská embryologie*, 2011 Grada
6. Kelleher, A.M., DeMayo, F.J., Spencer, T.E.: Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy, *Endocrine Reviews* 40: 1424 – 1445, 2019)
7. Manarguez, M., Pastor, L.M., Odeblad, E.: Morphological characterization of different human cervical mucus types using light and scanning electron microscopy., *Hum Reprod*, 2003, 18, p 1782-1789
8. Kunz G., Leyendecker G.: Uterine peristaltic activity during the menstrual cycle: characterization, regulation, function and dysfunction, *Reproductive Biomedicine Online*, Vol 4, Suppl. 3, 5-9, 2001)
9. Papanicolaou, G.N. : Some characteristic changes in the consistency of the uterine secretion - *Anatomical Record*, 1945 - WILEY-LISS DIV JOHN WILEY &
10. Rydberg, E. : Observations on the crystallization of the cervical mucus, *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, Vol 28., 1948)
11. Insler, V.; Melmed, H.; Eichenbrenner, I.; Serr, D.M.; Lunenfeld, B. The Cervical Score. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 1972, 10, 223–228, doi:10.1002/j.1879-3479.1972.tb00857.x.
12. Gray, C.A., Bartol, F., Tarleton B.J.: Developmental Biology of Uterine glands, *Biology of Reproduction*, Volume 65, issue 5, 1 November 2001, pages 1311-1323
13. Alemany, M.: Estrogens and the regulation of glucose metabolism. *World Journal of W J D Diabetes*. 2021, 12(10)
14. Crha K., Ventruba, P., Žáková J. et al.: The role of mesenchymal -epithelial transition in endometrial function and receptivity, *Czech Gyn.*, 5., 2019, p.371-375
15. Liang J., Wang S., Wang Z.: Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol.*, 2017, 15, p.90
16. Bai X., Zhen L., Li D et al. : Research progress of endometrial receptivity in patients with polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Reprod Biol. Endocrin.*, 2021, 19, 122
17. Dvořan M., Vodička J., Dostál J. et al.: Implantation and diagnostic of endometrial receptivity, *Czech Gyn.* 4, 2018, p 291-299
18. Mekiňová L., Jeřeta M., Crha I. et al. : Selected pathological conditions affecting endometrial receptivity, *Czech Gyn.*, 6., 2022, 1-7

19. Munro GM.: Uterine polyps, adenomyosis, leiomyomas, and endometrial receptivity, *Fertility and Sterility*, No 4., 2019, p.629-640
20. Crha K., Jeřeta M., Pilka R. et al. : Adenomyosis- its possible effect on endometrial function and receptivity, *Czech Gyn.*, 3., 2021, p.205-2
21. Curlin, M., Bursac, D. : Cervical mucus: from biochemical structure to clinical implications. *Frontiers Biosci*, 2013, 5, p. 507–515
22. Ulčová-Gallová, Z., Pešek, M., Mukenšnábl, P., et al. : Screening of endometrial NK cells in selected infertile patients. First part. Methods and current results. *Čes Gynek*, 2017, 82(5), s. 366–371
23. Ulčová-Gallová, Z.: Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus. *J Reprod Immunol*, 2010, 86, p. 115–121
24. Ulčová-Gallová, Z., Mukenšnábl, P., Haschová, M., et al. : NK buňky nejen v endometriu, ale i v ovulačním cervikálním sekretu u žen se sníženou plodností. *Čes Gynek*, 2019, 84(3), s. 184–189
25. Grande, G.; Milardi, D.; Vincenzoni, F.; et al.: Proteomic Characterization of the Qualitative and Quantitative Differences in Cervical Mucus Composition during the Menstrual Cycle. *Mol. Biosyst.* 2015, 11, 1717–1725, doi:10.1039/c5mb00071h.
26. Andersch-Björkman, Y., Thomsson, K.A., Holmén Larsson, J.M. et al. : Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle. *Mol. Cell. Proteomics MCP2007*, 6, 708–716, doi:10.1074/mcp.M600439-MCP200.
27. Dasari, S., Pereira, L., Reddy, A. et al.: Comprehensive Proteomic Analysis of Human Cervical-Vaginal Fluid. *Journal of Proteome Research* 2007, 6, 1258-1268
28. Hein, M.; Petersen, A.C.; Helmig, R.B.; et al.: Immunoglobulin Levels and Phagocytes in the Cervical Mucus Plug at Term of Pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2005, 84, 734–742, doi:10.1111/j.0001-6349.2005.00525.x.
29. Lacroix, G., Gouyer, V., Gottrand, F. et al.: The cervicovaginal Mucus Barrier, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(21), 8266; <https://doi.org/10.3390/ijms21218266>
30. Janků, P., Kacerovský, M., Andrys, C., et al.: Cervical fluid pentraxin-3 complicated by preterm prelabor rupture of membranes. *Fetal Diag Ther.* 2019, 46(6), p402-410
31. Grande, G., Vincenzoni, F., Milardi, D. : Cervical Mucus Proteome in Endometriosis. *Clin. Proteomics* 2017, 14, 7, doi:10.1186/s12014-017-9142-4.
32. Rocconi, R.P., Wilhite, A.M., Schambeau, L., : A Novel Proteomic-Based Screening Method for Ovarian Cancer Using Cervicovaginal Fluids: A Window into the Abdomen. *Gynecol. Oncol.* 2022, 164, 181–186, doi:10.1016/j.ygyno.2021.10.083.
33. Kawai, S., Fujii, T., Kukimoto, I. Et al.: Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia, *Scientific Reports* volume 8, Article number: 7070 (2018), p. 2-17, doi:10.1038/s41598-018-25310-1
34. Evans, J., Hutchison, J., Lois, A., et al.: Proteomic insights into endometrial receptivity and embryo-endometrial epithelium interaction for implantation reveal critical determinants of fertility. *Proteomics*, 2020, 20, p.1-13., doi: 10.1002/pmic.201900250

35. Evans, J., Walker, K.J., Bilandzic, M., et al. : A novel embryo-endometrial adhesion model can potentially predict receptive or non receptive endometrium. *J. Assist Reprod Genet*, 2020, 37, p.5-16, doi: 10.1007/s10815-019-01629-0. Epub 2019 Nov 27
36. Filicori, M., Cognigni, G.E., Arnone, R. et al. : Role of Different GnRH Agonist Regimens in Pituitary Suppression and the Outcome of Controlled Ovarian Hyperstimulation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 1996, 11 Suppl 3, 123–132, doi:10.1093/humrep/11.suppl_3.123.
37. Devroey, P., Aboulghar, M., Garcia-Velasco, J.: Improving the Patient's Experience of IVF/ICSI: A Proposal for an Ovarian Stimulation Protocol with GnRH Antagonist Co-Treatment. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 2009, 24, 764–774, doi:10.1093/humrep/den468.
38. Antharavally, B.S.; Mallia, K.A.; Rangaraj, P. et al. : Quantitation of Proteins Using a Dye-Metal-Based Colorimetric Protein Assay. *Anal. Biochem.* 2009, 385, 342–345, doi:10.1016/j.ab.2008.11.024.
39. Wiśniewski, J.R.; Zougman, A.; Nagaraj, N. et al. : Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis. *Nat. Methods* 2009, 6, 359–362, doi:10.1038/nmeth.1322.
40. Rappsilber, J.; Ishihama, Y.; Mann, M. : Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Anal. Chem.* 2003, 75, 663–670, doi:10.1021/ac026117i.
41. The, M.; MacCoss, M.J.; Noble, W.S. et al. : Fast and Accurate Protein False Discovery Rates on Large-Scale Proteomics Data Sets with Percolator 3.0. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2016, 27, 1719–1727, doi:10.1007/s13361-016-1460-7.
42. MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N. et al.: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2010, 26, 966–968, doi:10.1093/bioinformatics/btq054.
43. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L. : Metascape Provides a Biologist-Oriented Resource for the Analysis of Systems-Level Datasets. *Nat. Commun.* 2019, 10, 1523, doi:10.1038/s41467-019-09234-6.
44. Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C. et al. : The STRING Database in 2021: Customizable Protein-Protein Networks, and Functional Characterization of User-Uploaded Gene/Measurement Sets. *Nucleic Acids Res.* 2021, 49, D605–D612, doi:10.1093/nar/gkaa1074.
45. Thul, P.J., Åkesson, L., Wiking, M., et al. : A Subcellular Map of the Human Proteome. *Science* 2017, 356, eaal3321, doi:10.1126/science.aal3321.
46. Palomba, A., Abbondio, M., Fiorito, G. et al. : Comparative Evaluation of MaxQuant and Proteome Discoverer MS1-Based Protein Quantification Tools. *J. Proteome Res.* 2021, 20, 3497–3507, doi:10.1021/acs.jproteome.1c00143.
47. Shaw, J.L.V.; Smith, C.R.; Diamandis, E.P. : Proteomic Analysis of Human Cervico-Vaginal Fluid. *J. Proteome Res.* 2007, 6, 2859–2865, doi:10.1021/pr0701658.
48. Tang, L.-J.; De Seta, F.; Odreman, F., et al. : Proteomic Analysis of Human Cervical-Vaginal Fluids. *J. Proteome Res.* 2007, 6, 2874–2883, doi:10.1021/pr0700899.
49. Panicker, G., Lee, D.R., Unger, E.R. : Optimization of SELDI-TOF Protein Profiling for Analysis of Cervical Mucous. *J. Proteomics* 2009, 71, 637–646, doi:10.1016/j.jprot.2008.11.004.
50. Ma, Z., Chen, J., Luan, T. et al. : Proteomic Analysis of Human Cervical Adenocarcinoma Mucus to Identify Potential Protein Biomarkers. *PeerJ* 2020, 8, e9527, doi:10.7717/peerj.9527

51. Maddison, J.W., Rickard, J.P., Bernecic, N.C., et al.: Oestrus Synchronisation and Superovulation Alter the Cervicovaginal Mucus Proteome of the Ewe. *J. Proteomics*2017, 155, 1–10, doi:10.1016/j.jprot.2017.01.007.
52. Lee, D.-C., Hassan, S.S., Romero, R., et al.: Protein Profiling Underscores Immunological Functions of Uterine Cervical Mucus Plug in Human Pregnancy. *J. Proteomics*2011, 74, 817–828, doi:10.1016/j.jprot.2011.02.025.
53. Han, L., Park, D., Reddy, A. et al. : Comparing Endocervical Mucus Proteome of Humans and Rhesus Macaques. *Proteomics Clin. Appl.*2021, 15, e2100023, doi:10.1002/prca.202100023.
54. Shaw, J.L.V.; Smith, C.R.; Diamandis, E.P. Proteomic Analysis of Human Cervico-Vaginal Fluid. *J. Proteome Res.*2007, 6, 2859–2865, doi:10.1021/pr0701658.
55. Comparetto, C.; Borruto, F. : Cervical Cancer Screening: A Never-Ending Developing Program. *World J. Clin. Cases*2015, 3, 614–624, doi:10.12998/wjcc.v3.i7.614.
56. Rylova, G.; Ozdian, T.; Varanasi, L. et al. : Affinity-Based Methods in Drug-Target Discovery. *Curr. Drug Targets*2015, 16, 60–76, doi:10.2174/1389450115666141120110323
57. Antharavally, B.S., Mallia, K.A., Rangaraj, P. et al : Quantitation of Proteins Using a Dye-Metal-Based Colorimetric Protein Assay. *Anal. Biochem.*2009, 385, 342–345, doi:10.1016/j.ab.2008.11.024.
58. Ozdian, T., Holub, D., Maceckova, Z., et al. : Proteomic Profiling Reveals DNA Damage, Nucleolar and Ribosomal Stress Are the Main Responses to Oxaliplatin Treatment in Cancer Cells. *J. Proteomics*2017, 162, 73–85, doi:10.1016/j.jprot.2017.05.005.
59. Wiśniewski, J.R.: Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Anal. Chem.*2016, 88, 5438–5443, doi:10.1021/acs.analchem.6b00859.
60. Erde, J., Loo, R.R.O., Loo, J.: Enhanced FASP (EFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. *J. Proteome Res.*2014, 13, 1885–1895, doi:10.1021/pr4010019.
61. Odeblad, E. : The Discovery of Different Types of Cervical Mucus and the Billings Ovulation Method®. *Bull. Ovul. Method Res. Ref. Cent. Aust.*1994, 21, 3–35.
62. Barrios De Tomasi, J., Opata, M.M., Mowa, C.N.: Immunity in the Cervix: Interphase between Immune and Cervical Epithelial Cells. *J. Immunol. Res.*2019, 2019, 7693183, doi:10.1155/2019/7693183.
63. Wang, Y.-Y., Kannan, A., Nunn, K.L. et al. : IgG in Cervicovaginal Mucus Traps HSV and Prevents Vaginal Herpes Infections. *Mucosal Immunol.*2014, 7, 1036–1044, doi:10.1038/mi.2013.120.
64. Hein, M.; Petersen, A.C.; Helmig, R.B. et al. : Immunoglobulin Levels and Phagocytes in the Cervical Mucus Plug at Term of Pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*2005, 84, 734–742, doi:10.1111/j.0001-6349.2005.00525.x.
65. Zheng, Y.; Li, Z.; Xiong, M. et al. : Hormonal Replacement Treatment Improves Clinical Pregnancy in Frozen-Thawed Embryos Transfer Cycles: A Retrospective Cohort Study. *Am. J. Transl. Res.*2013, 6, 85–90.
66. De Sutter, P.; Veldeman, L.; Kok, P. et al : Comparison of Outcome of Pregnancy after Intra-Uterine Insemination (IUI) and IVF. *Hum. Reprod.*2005, 20, 1642–1646, doi:10.1093/humrep/deh807.
67. Gekka, Y., Nakagawa, K., Watanabe, H. et al. : Comparison of Pregnancy Outcomes Between Fresh Embryo Transfer in a Natural IVF Cycle and IUI Cycle Among Infertile Young Women. *J. Reprod. Infertil.*2022, 23, 93–99, doi:10.18502/jri.v23i2.8993.

68. von Wolff, M., Fäh, M., Roumet, M. et al.: Thin Endometrium Is Also Associated With Lower Clinical Pregnancy Rate in Unstimulated Menstrual Cycles: A Study Based on Natural Cycle IVF. *Front. Endocrinol.*2018, 9.
69. Bourgain, C., Devroey, P.: The Endometrium in Stimulated Cycles for IVF. *Hum. Reprod. Update*2003, 9, 515–522, doi:10.1093/humupd/dmg045.
70. Adams, S.M., Terry, V., Hosie, M.J. et al.: Endometrial Response to IVF Hormonal Manipulation: Comparative Analysis of Menopausal, down Regulated and Natural Cycles. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE*2004, 2, 21, doi:10.1186/1477-7827-2-21.
71. Li, M.-Q., Jin, L.-P.: Ovarian Stimulation for in Vitro Fertilization Alters the Protein Profile Expression in Endometrial Secretion. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*2013, 6, 1964.
72. Han, L.; Padua, E.; Hart, K.D. et al.: Comparing Cervical Mucus Changes in Response to an Oral Progestin or Oestrogen Withdrawal in Ovarian-Suppressed Women: A Clinical Pilot. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care Off. J. Eur. Soc. Contracept.*2019, 24, 209–215, doi:10.1080/13625187.2019.1605503.
73. Natavio, M.F., Taylor, D., Lewis, R.A. et al. : Temporal Changes in Cervical Mucus after Insertion of the Levonorgestrel-Releasing Intrauterine System. *Contraception*2013, 87, 426–431, doi:10.1016/j.contraception.2012.09.034.
74. Steward, R., Melamed, A., Granat, A. et al. : Comparison of Cervical Mucus of 24/4 vs. 21/7 Combined Oral Contraceptives. *Contraception*2012, 86, 710–715, doi:10.1016/j.contraception.2012.05.004.
75. Wira, C.R.,Rodriguez-Garcia, M., Patel, M.V.: The Role of Sex Hormones in Immune Protection of the Female Reproductive Tract. *Nat. Rev. Immunol.*2015, 15, 217–230, doi:10.1038/nri3819.
- 76.Boomsma, C.M., Kavelaars, A., Eijkemans, M.J.C. et al. : Cytokine Profiling in Endometrial Secretions: A Non-Invasive Window on Endometrial Receptivity. *Reprod. Biomed. Online*2009, 18, 85–94, doi:10.1016/s1472-6483(10)60429-4.

14. Publikační činnost autora

Původní vědecké publikace v souvislosti s tématem dizertační práce uveřejněné v časopise s IF

1. Tomáš Oždian, †, **Jan Vodička** †, Jiří Dostál, Dušan Holub , Jana Václavková , Michal Ješeta , Barbora Hamerníková , Pavla Kouřilová , Ondřej Malchar , Vladimír Dvořák , Pavel Hejtmánek , Kateřina Sobková , Pavel Ventruba , Radovan Pilka , Petr Džubák , and Marián Hajdúch. Proteome Mapping of Cervical Mucus and Its Potential as a Source of Biomarkers in Female Tract Disorders. *Int.J.Mol.Sci.*2023,24,1038, <https://doi.org/10.3390/ijms24021038>

† společní autoři (Příloha 1.)

Původní vědecká publikace v souvislosti s tématem dizertační práce uveřejněná v recenzovaném časopise

1. **Vodička, J.**, Dostál, J., Holub, D., Pilka, R., Džubák, P., Hajdúch, M., Oždian, T. Tissue expression analysis of cervical mucus proteome, *Czech Gyn.*2023
(Příloha 2.)

Přehledné vědecká publikace v souvislosti s tématem dizertační práce

1. Dvořan M., **Vodička J.**, Dostál J., Hajdúch M., Džubák P., Pešková M., Pilka R. Implantace a diagnostika receptivity endometria, *Čes. Gynek.*, 2018,83,4, s. 291-299
(Příloha 3.)
2. Crha K., Ventruba P., Žáková J., Ješeta M., Pilka R., **Vodička J.**, Serpa P. Přeměna mesenchymálních a epiteliálních buněk - vliv na funkci a receptivitu endometria, *Čes.Gynek.*, 2019, 84, 5, s.371-375
3. Crha K., Ventruba P., Žáková J., Ješeta M., Pilka R., **Vodička J.**, Crha I. Cervikální sekret – důležitý faktor reprodukce, *Čes.Gynek.*, 2020,85,5, s.333-338
4. Crha K., Ješeta M., Pilka R., Ventruba P., Žáková J., **Vodička J.**, Crha I. Adenomyoza – možný vliv na funkci a receptivitu endometria, *Čes. Gynek.*, 2021,86,3,s.205-209
5. Mekiňová L., Ješeta M., Crha I., Crha K., **Vodička J.**, Hudeček R., Remundová K., Matušková E., Pilka R. Vybrané patologické stavy ovlivňující receptivitu endometria, *Čes.Gynek.*,2022,87,6, s. 416-422

6. **Vodička J.**, Receptivita endometria,*Gynek.*,2020
7. **Vodička J.**, Dvořan M.,Smékalová K.,Michnová L.,Hejtmánek P.,Lehnertová K.,Dostál J.,Pešková M.,Annenková M., Pilka R.Možnosti přípravy endometria ke kryoembryotransferu,*Čes.Gynek.*,2018,83,1,s 24-28

Přehledné vědecké publikace

1. Crha K., Ješeta M., Pilka R., Kašík M., Mekiňová L., **Vodička J.**, Crha I.
Asistovaná reprodukce u mužů s Klinefelterovým syndromem, *Čes.Gynek.*,2022,87,2,s.133-136

15. Přílohy



Article

Proteome Mapping of Cervical Mucus and Its Potential as a Source of Biomarkers in Female Tract Disorders

Tomáš Oždian ^{1,†}, Jan Vodička ^{2,3,†}, Jiří Dostál ^{2,3}, Dušan Holub ¹, Jana Václavková ¹, Michal Jeřeta ^{4,5}, Barbora Hamerníková ¹, Pavla Kouřilová ¹, Ondřej Malchar ^{2,3}, Vladimír Dvořák ^{2,3}, Pavel Hejtmánek ^{2,3}, Kateřina Sobková ^{2,3}, Pavel Ventruba ^{4,5}, Radovan Pilka ^{2,3}, Petr Džubák ^{1,6,*} and Marián Hajdúch ^{1,6,*}

- ¹ Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc, Czech Republic
 - ² Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital in Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc, Czech Republic
 - ³ Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital in Olomouc, I.P.Pavlova 6, 779 00 Olomouc, Czech Republic
 - ⁴ Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Brno, Obilni trh 11, 625 00 Brno, Czech Republic
 - ⁵ Department of Gynecology and Obstetrics, Masaryk University Brno, Obilni trh 11, 625 00 Brno, Czech Republic
 - ⁶ Laboratory of Experimental Medicine, University Hospital in Olomouc, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc, Czech Republic
- * Correspondence: petr.dzubak@upol.cz (P.D.); marian.hajduch@upol.cz (M.H.); Tel.: +420-585-632-150 (P.D.); +420-585-632-127 (M.H.)
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Cervical mucus (CM) is a viscous fluid that is produced by the cervical glands and functions as a uterine cervix plug. Its viscosity decreases during ovulation, providing a window for non-invasive sampling. This study focuses on proteomic characterization of CM to evaluate its potential as a non-invasively acquired source of biomarkers and in understanding of molecular (patho)physiology of the female genital tract. The first objective of this work was to optimize experimental workflow for CM processing and the second was to assess differences in the proteomic composition of CM during natural ovulatory cycles obtained from intrauterine insemination (IUI) cycles and in vitro fertilization (IVF) cycles with controlled ovarian hyperstimulation. Proteomic analysis of CM samples revealed 4370 proteins involved in processes including neutrophil degranulation, cellular stress responses, and hemostasis. Differential expression analysis revealed 199 proteins enriched in IUI samples and 422 enriched in IVF. The proteins enriched in IUI were involved in phosphatidic acid synthesis, responses to external stimulus, and neutrophil degranulation, while those enriched in IVF samples were linked to neutrophil degranulation, formation of a cornified envelope and hemostasis. Subsequent analyses clarified the protein composition of the CM and how it is altered by hormonal stimulation of the uterus.

Keywords: proteomics; cervical mucus; gynecology; intrauterine insemination; in vitro fertilization



Citation: Oždian, T.; Vodička, J.; Dostál, J.; Holub, D.; Václavková, J.; Jeřeta, M.; Hamerníková, B.; Kouřilová, P.; Malchar, O.; Dvořák, V.; et al. Proteome Mapping of Cervical Mucus and Its Potential as a Source of Biomarkers in Female Tract Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1038. <https://doi.org/10.3390/ijms24021038>

Academic Editor: Guillaume Martínez

Received: 10 December 2022

Revised: 30 December 2022

Accepted: 31 December 2022

Published: 5 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cervical mucus is a gel containing a plethora of glycoproteins, lipids, nucleic acids, and metabolites. Its biological function depends heavily upon macromolecular composition. The mucus plays a vital role in protecting the vaginal epithelium during sexual intercourse and in the innate protection of the uterine cavity, thereby helping to ensure fertility [1], sperm capacitation, and restricting sperm passage within the female reproductive tract (FRT) to the periovulatory period. However, its functions are not yet fully understood. Moreover, the biological and chemical–physical properties of cervical mucus change during the menstrual cycle [1,2]: its content of glycoproteins (mucins) peaks near ovulation due to high secretion, but the abundance of other proteins is highest during the luteal phase [3]. During the first half of the cycle, the mucus is scant, thick and viscous, forming a barrier

or cervical plug that limits the access of sperm to the upper genital tract. Then, immediately before ovulation, when estrogens are produced in increasing amounts, its viscosity decreases while its volume increases 10- to 20-fold, thereby maximizing its permeability to spermatozoa. The composition of cervical mucus changes immediately after ovulation when the corpus luteum of the ovary begins synthesizing progesterone. Progesterone reduces the quantity and composition of cervical mucus, making it thicker and stickier [4]. The biochemical processes underlying these changes are poorly understood, but it is known that changes in the number and types of polysaccharide chains (glycans) attached to proteins during post-translational modification can drastically increase the proteins' molecular

weights and thereby alter their solubility, solution viscosity, and biological function.

The uterine cavity, which is directly connected to the cervix, is coated with endometrial tissue that undergoes physiological remodeling induced by ovarian hormones. The human uterine proteome during the menstrual cycle has been studied by analyzing both the endometrial epithelium [5] and the uterine fluid [6]. However, the variation of the proteome of the uterine fluid over the course of the cycle is unknown. In addition, because the uterine cavity releases substances into the uterine fluid that may influence the entire reproductive system, the cervical mucus's proteome may reflect the functional status of the endometrial tissue [7] and potentially also the fallopian tubes and ovaries. Thus, cervical mucus analysis could provide valuable information to support diagnosis, prognosis, and therapy of female tract disorders. Early detection of markers in cervical fluid proximal to diseased tissues may replace of complement venous blood and thus increase sensitivity of detection and in turn the range of therapeutic options available for individuals affected by diseases, enable more effective early treatment, and facilitate the identification of factors involved in pathogenesis.

However, only a few studies have investigated the protein composition of cervical mucus. Andersch-Björkman et al. [8] reported comprehensive proteomic and glycomic LC-MS analyses of cervical mucus samples collected from 12 women at multiple stages of the menstrual cycle (before, during, and after ovulation), while Panicker et al. optimized a SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption/ionization with time-of-flight mass analyzer) MS method for cervical mucus analysis [9]. Additionally, Grande et al. confirmed that cervical mucus is a rich source of protein biomarkers, determined the protein composition of cervical mucus samples from five fertile women with term delivery during the year preceding the study, and characterized the changes in the cervical mucus proteome during the menstrual cycle [10]. In another study, high-resolution mass spectrometric analysis of cervical mucus from ten infertile women with ovarian endometriotic cysts revealed that this chronic disease is characterized by inflammatory protein expression [11]. Changes in expression levels of cytokines (IFN-gamma, CM-CSF, RANTES, and eotaxin) in cervical mucus were described by Otani et al. (2019) in a patient with cervical dysplasia and cervical cancer [12]. Finally, Rocconi et al. (2021) recently analyzed the cervical mucus proteome for the purposes of ovarian cancer screening [13], and Finan et al. (2012) identified 10 cervical mucus proteins that can be used to confidently diagnose endometrial cancer [14]. These findings clearly show that the cervical mucus proteome contains information that could be valuable in diagnosing diverse pathologies and abnormalities in humans.

Although several proteomic analyses of cervical mucus were reported previously, the studies usually suffer from a low number of enrolled patients, and several studies sampled mucus irrespectively of the menstrual cycle. The definition of the normal cervical mucus proteome is particularly complicated, as we know its composition is heavily dependent on the ovarian cycle and estrogen levels. In order to standardize the sampling of biological material, we performed non-invasive sampling of cervical mucus during the

periovalution period in healthy women undergoing artificial insemination or in vitro fertilization (IVF) due to male factor infertility. Experiments have been conducted to determine whether removing cervical mucus during intra-uterine insemination (IUI) might increase pregnancy rates [15], and there is evidence that clomiphene citrate (a drug used for ovarian stimulation in IVF fertility treatment) can alter the quality of cervical mucus [16,17]. IUI is based on women’s natural cycles and thus represents the normal biology of cervical mucus, whereas IVF-stimulated cycles represent a cervical mucus “model system” in which hormonal medication is administered with a standardized timing that allows for the timing of ovulation to be predicted very accurately, making it possible to sample the cervical mucus directly at the time of ovum pick-up.

2. Results

2.1. Patient Characteristics

The clinical characteristics of the participants in the study are summarized in Table 1.

Table 1. Characteristics of the participating patients. Where relevant, values are quoted as means with minima and maxima in parentheses. Age, height, weight and smoker status were obtained during initial visit, AMH and FSH were analyzed from peripheral blood, and endometrial thickness was determined via ultrasound examination at oocyte retrieval procedure. Patients in the IUI group were undergoing intrauterine insemination without hormone stimulation while those in the IVF group were undergoing in vitro fertilization with stimulated cycles. Pregnancy rates were defined as clinically confirmed pregnancy. The population characteristics and hormone levels apply to the date of CM aspiration.

Parameters	All Patients	IUI Group	IVF Group
Count of patients in the group	19	10	9
Age (years)	32.1 (25–43)	33.8 (26–43)	30.2 (25–36)
BMI (kg/m ²)	25.1 (19–46)	25.7 (19–46)	24.5 (20–33)
AMH (ng/mL)	3.8 (0.8–8.6)	3.5 (0.8–6.8)	4.2 (2.0–8.6)
FSH on the third day (IU/l)	5.7 (2.7–10.9)	6.9 (2.7–10.9)	4.8 (4.1–6.5)
Infertility duration (years)	3.0 (0–7)	3.25 (1–6)	2.6 (0–7)
Number of deliveries	0.4 (0–2)	0.6 (0–2)	0.2 (0–1)
Number of abortions	0	0	0
Smoker (%)	21	30	11
Endometrium on the CM collection day (mm)	9.4 (6–15)	8.6 (6–15)	10.3 (8–14)
Number of retrieved oocytes	12.9 (3–23)/NA ¹	NA	12.9 (3–23)
Pregnancy rate (%)	26	10	44

¹ Not applicable in the IUI group. Abbreviations: BMI—body mass index, AMH—anti-Müllerian hormone, FSH—follicle stimulating hormone, CM—cervical mucus.

2.2. Quality Control of the Dataset

The LC-MS analyses of all samples examined in this study were performed in a single batch. The stability of the analyses was evaluated retrospectively using the doubly charged peptide YICDNQDTISSK as a reference analyte. This peptide had a retention time of 29.22 ± 0.32 min (1% RSD), with a FWHM of 0.13 ± 0.007 min (5.5% RSD), a maximal peak height of $6.19 \times 10^8 \pm 4.11 \times 10^7$ (6.6% RSD), and an average mass error of 0.57 ± 0.57 ppm. All these values are below the 15% RSD cutoff commonly applied in LC-MS analyses, and the peptide’s mass error was below the 3 ppm cut-off used internally in our facility.

2.3. Proteomic Characterization of the Cervical Mucus

In the final search, a total of 4370 proteins (Table S1), 34,166 peptides, and 470,013 peptide spectrum matches were identified over all 19 samples collectively using ProteomeDiscoverer 2.5. The counts of identified peptides and proteins differed significantly between the IUI and IVF groups (Figure 1A,B). For the IUI group, the average number of proteins identified with high confidence was 97 ± 70 per sample (341 ± 260 peptides). However, there were two outlier samples (I2 and I5) in which 1538 proteins and 7668 peptides were identified. Conversely, the average number of proteins identified with high confidence in the

IVF group was 1640 ± 428 per sample (8543 ± 2613 peptides). This group had a single outlier sample (F3) in which 60 proteins and 163 peptides were identified.

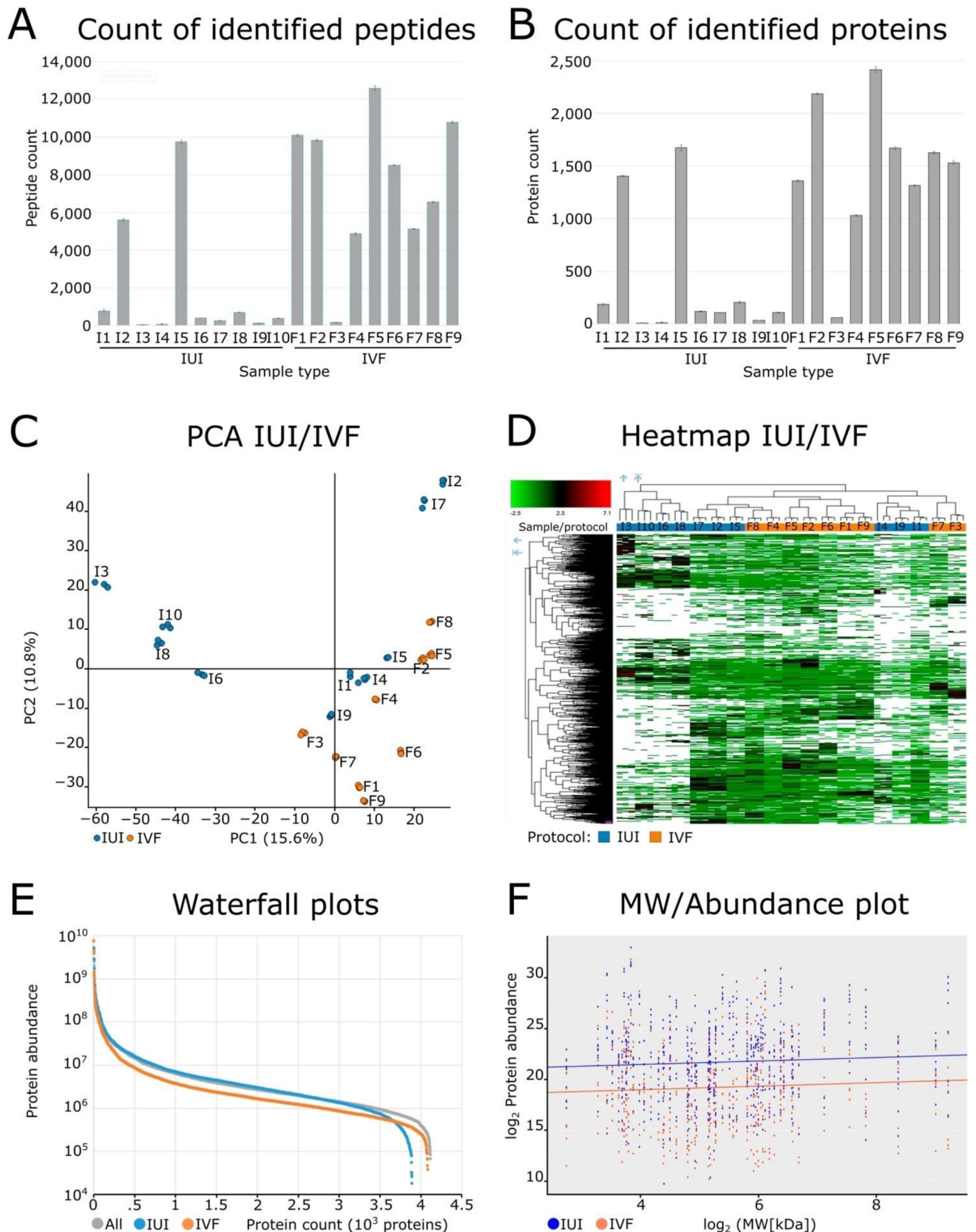


Figure 1. Proteomic characterization of the analyzed samples. Graph (A) shows the counts of peptides identified in each sample (one bar corresponds to the average of three technical replicates \pm standard deviation). Graph (B) shows the counts of proteins in each sample (one bar corresponds to the average of three technical replicates \pm standard deviation). The PCA plot (C) and heatmap (D) illustrate global differences among samples. The PCA plot is centered and scaled. The heatmap parameters were scaled before clustering and calculating squared Euclidean distances. The waterfall plot (E) shows the distribution of normalized protein abundances. The MW/abundance plot (F) shows the normalized protein abundances and molecular weights of the 63 proteins that were identified in all samples and replicates in IUI and IVF groups, respectively.

The protein quantification results were visualized using a PCA scores plot (Figure 1C) and a heatmap (Figure 1D). The PCA plot and the heatmap both revealed no clear trends in the composition of the cervical mucus; the first and second principal components of the PCA explained only 15.6% and 10.8% of the variance in the data, respectively. The heatmap had two main clusters, one containing only IUI samples only and one containing samples from both groups. This suggests that the effects of hormone stimulation on the composition of the cervical mucus are outweighed by variation due to other factors.

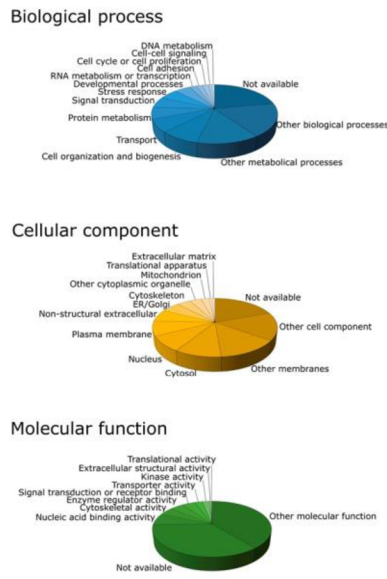
The Minora feature detector [18] proved to be very useful in the quantitative analysis of the cervical mucus proteomic data. This ProteomeDiscoverer node performs peptide identification based on tandem mass spectra by linking peaks in the spectrum of one sample to the corresponding retention times and parent peptide masses in other samples, thus effectively reducing the number of missing values in the results. When applied to our dataset, it increased the number of quantified proteins in samples with insufficient identifications (i.e., only about 200 proteins identified with a high score). The numbers of proteins identified in the quantitative analysis exceeded those initially identified in the samples, as can be seen in the waterfall graph shown in Figure 1E. In addition, the normalized abundance of proteins in the IUI group was clearly higher than that in both the IVF group and the general proteome. Thus, although the IUI samples contained fewer different proteins than the IVF samples, the proteins that were present were more abundant. The low numbers of proteins in the IUI group could be for instance due to the expression of proteins with variable molecular weight and thus altered diffusion capacity into the cervical mucus of IUI versus IVF samples. To test this hypothesis, we focused on the 63 proteins that were quantified in all replicates of all samples and calculated the correlation between their MW and their measured abundance (Figure 1F). However, this revealed no significant differences between the IUI and IVF groups.

Upon applying common criteria for identifying enriched proteins (a log₂ fold change of at least 1 and a *p* value below 0.05), we identified 199 and 422 proteins that were enriched in the IUI (Table S2) and IVF samples, respectively (Table S3). These numbers are higher than the average counts of identified proteins in the IUI samples. We therefore examined the non-imputed datasets of quantified proteins in the IUI- and IVF-enriched protein groups. The finding that fewer proteins were identified in the IUI samples was supported by the results for the IVF-enriched proteins, of which 214 were specific to the IVF group. Another 34 proteins were present only in the IVF group and the positive outlier samples I2 and I5 from the IUI group, while the remaining IVF-enriched proteins were identified in both groups. The intensities of the IUI-enriched proteins were distributed homogeneously across the samples.

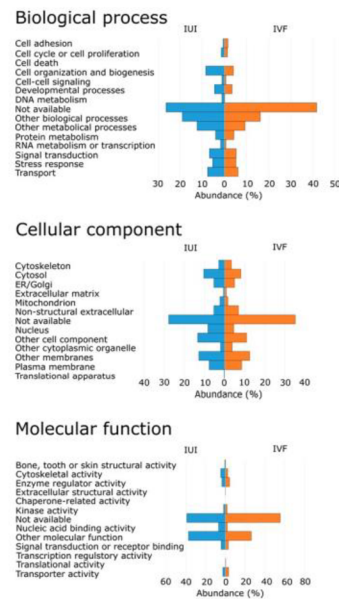
2.4. Protein Annotation of Identified Proteins

The protein annotation analysis was performed in ProteomeDiscoverer and Metascape (Figure 2). When considering the full set of proteins identified across all samples (representing the general cervical mucus proteome), the most frequent biological process annotations were other biological (18%) and other metabolic (13%) processes, followed by cell organization (8%), transport (7%), protein metabolism (6%) and signal transduction (6%). The most frequent cellular component annotations were other cellular components (15%), other membranes (13%), and cytosol (10%), followed by the nucleus (8%), plasma membrane (8%), non-structural extracellular (6%) and ER/Golgi (5%). The most frequent molecular function annotation was other molecular function (39%), followed by nucleic acid binding activity (6%), cytoskeletal activity (4%), enzyme regulator activity (4%), and signal transduction or receptor binding (4%). No GO annotations were obtained for around 20% of the proteins, which demonstrates a knowledge gap we have in understanding cervical molecular physiology.

All identified proteins



Differentially regulated proteins



Enrichment heatmaps

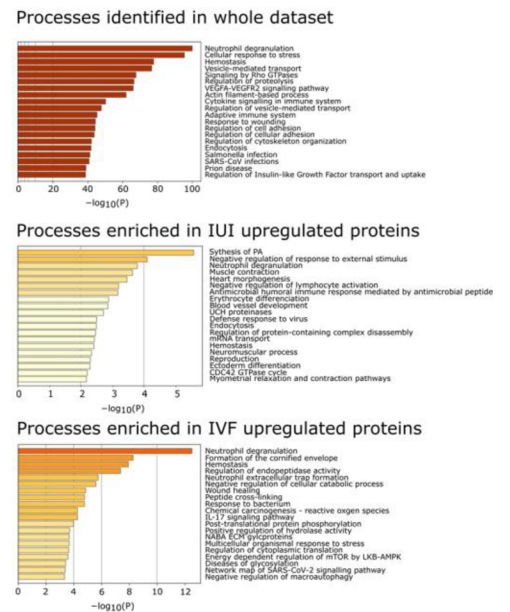


Figure 2. Protein annotation results for the cervical mucus proteome. Annotations for the three main GO term categories—biological function, cellular component, and molecular function—were generated using ProteomeDiscover for the complete cervical mucus proteome and for the sets of proteins exhibiting differential expression in the IUI and IVF samples. Additional annotations based on the Metascape [19] enrichment heatmap were also obtained for these three protein sets.

The annotation distribution for the set of IUI-enriched proteins was similar to that for the general cervical mucus proteome in all three GO main branches. The biological process annotations exhibiting the most pronounced differences in frequency between the IUI-enriched and general protein sets were no known biological processes (+4.4% in the IUI-enriched set), other biological processes (+0.8%), signal transduction (+0.7%), cell adhesion (-1.4%), other metabolic processes (-1.3%) and protein metabolism (-2.31%). The frequencies of all other biological process annotations in the IUI-enriched set were comparable to those in the general set. The only cellular component annotation whose frequency in the IUI-enriched set differed markedly from that in the general set was no known cellular component (+8.3% in the IUI-enriched set); the frequencies of all other cellular component annotations differed by <2% between the two sets. The only molecular function annotation whose frequency in the IUI-enriched set differed markedly from that in the general set was no known molecular function (+3.2%); the frequencies of all other annotations differed by <2% between the two sets.

Cell process annotations whose frequencies in the IVF-enriched protein set differed substantially from those in the general set were no known biological process (+20% in the IVF-enriched set), cell organization (-4.5%), developmental processes (-1.5%), DNA metabolism (-0.7%), other biological processes (-2%), other metabolic processes (-4.5%), protein metabolism (-2%), RNA metabolism (-1.5%) and transport (-1%). Other cell process annotations (e.g., cell adhesion, cell cycle, cell-cell signaling, signal transduction, and stress response) had similar frequencies in the two sets. Similar results were obtained for cellular component annotations—the annotations exhibiting substantial differences in frequency were no known cellular component (+16% in the IVF-enriched set), cytoskeleton (-1%), cytosol (-2%), ER/Golgi (-1%), mitochondrion (-1%), nucleus (-4%), other cell components (-5%), other membranes (-1%), and translation (-1%). The remaining cell component annotations (plasma membrane, non-structural extracellular, other cytoplasmic organelles, and extracellular matrix) had similar frequencies in the two sets. The molecular function annotations whose frequencies differed markedly between the IVF and general sets were no known molecular function (+20% in the IVF set), cytoskeletal activity (-2.1%), nucleic acid binding activity (-4.2%), other molecular functions (-12.6%), signal transduction activity or receptor binding (-1.2%), and transporter activity (-0.8%). The other molecular function annotations (bone, tooth, or skin

structural activity, enzyme regulator activity, extracellular structural activity, kinase activity, and translational activity) had similar frequencies in the two sets.

Because of the high number of “other” process annotations (which do not enable further analysis) in the ProteomeDiscoverer results, we used the Metascape software to acquire additional annotations. This algorithm combines functional enrichment, interactome analysis, gene annotation, and membership search to leverage over 40 independent knowledgebases within a single integrated portal [19] and generates results that can be visualized in the form of enrichment heatmaps (see Figure 2). Annotations assigned to the general cervical mucus proteins in the Metascape analysis included neutrophil degranulation, cellular response to stress, hemostasis, vesicle-mediated transport, and signaling by Rho GTPases.

In accordance with the results for the general cervical mucus proteome, the most enriched annotation in the enrichment heatmap for the differentially expressed proteins in the IVF samples was neutrophil degranulation, and the third most enriched was hemostasis. However, the order of enrichment for the other annotations of the IVF set differed: the second most enriched annotation was formation of a cornified envelope, the fourth was regulation of endopeptidase activity, and the fifth was neutrophil extracellular trap formation. The high number of proteins without annotation can also be explained by the fact that 46% of all differentially regulated IVF proteins were immunoglobulins.

The enrichment heatmap also revealed differences between the annotation distributions of the IUI-enriched proteins and the complete cervical mucus proteome. The annotation exhibiting the greatest enrichment in the IUI set was the synthesis of phosphatidic acid, an essential precursor of phospholipids. The second most enriched annotation was negative regulation of response to external stimulus, followed by neutrophil degranulation processes, muscle contraction, and heart morphogenesis. Unfortunately, no annotations were obtained for around 20% of the 4370 proteins identified in the full cervical mucus proteome. This was attributed to two factors. First, 1716 of these proteins lacked a gene symbol assigned by the Uniprot database. Second, 1178 of them were identified as immunoglobulins (mostly variable regions). Only 34 Ig proteins have a gene symbol, and to the best of our knowledge, there is currently no good tool for the biological interpretation of different immunoglobulin variants.

2.5. Proteins Discriminating IUI and IVF Groups

Separate from the biological interpretation of the proteomic data is the question of which proteins most effectively discriminate IUI from IVF and thus physiological versus hormone-stimulated ovarian cycle. To identify such discriminatory proteins, we used the Wilcoxon exact test and Fisher’s test. This revealed that 29 normalized and imputed source proteins were detected in at least two replicates of all analyzed samples (Table 2), of which 14 were enriched in IUI and 15 in IVF. Four proteins were tissue enhanced in FRT, while some others exhibited group-enriched tissue expression in tissue groups that included the uterine cervix.

Table 2. The list of proteins distinguishing IUI from IVF cohorts. Those proteins were quantified in at least two replicates of all samples and have Wilcoxon test *p* values below 0.05. The protein intensities in the IUI and IVF columns are reported as medians with the minimum and maximum values of the log2-transformed aggregated intensity shown in parentheses. Log2 fold changes were calculated based on the median values and are reported as IUI/IVF ratios. Tissue expression data are from the Human protein atlas [20].

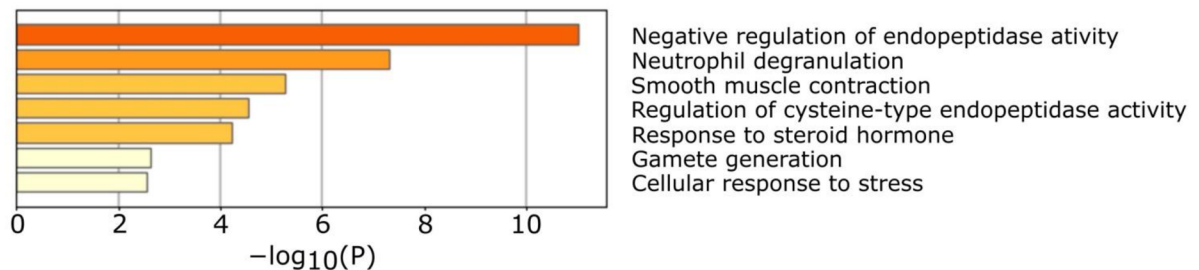
Protein	Uniprot ID	Gene Symbol	IUI	IVF	Log 2 Fold Change	Wilcox Test <i>p</i> -Value	Tissue Expression
WAP four-disulfide core domain protein 2	Q14508	WFDC2	22.23 (21.61–23.18)	28.58 (28.07–30.04)	−6.35	0.00009	Tissue enhanced (cervix, salivary gland)
Enoyl-CoA hydratase	H0YFD6	HADHA	27.4 (26.34–28.32)	22.5 (21.77–24.36)	4.9	0.00015	Tissue enhanced (skeletal muscle)
Dopamine receptor interacting protein 4	Q4W4Y1	DRIP4	24.65 (23.99–29.22)	21.67 (21.64–22.17)	2.98	0.00026	N/A
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Q99460	PSMD1	20.81 (20.02–21.45)	23.23 (22.66–23.39)	−2.42	0.00097	Low tissue specificity
Serpin family A member 3	A0A024R6P0	SERPINA3	23.81 (22.91–24.6)	26.63 (25.33–26.82)	−2.82	0.00097	Group enriched (liver, pancreas)
Connective tissue growth factor	Q5M8T4	CTGF	24.38 (22.83–25.49)	20.38 (20.24–20.76)	4	0.00145	N/A
Glucose-6-phosphate isomerase	P06744	GPI	24.68 (23.75–31.52)	22.16 (21.69–22.44)	2.52	0.00145	Low tissue specificity
Laminin subunit gamma-2	Q13753	LAMC2	25.02 (23.24–25.35)	21.37 (21.04–21.54)	3.65	0.00210	Tissue enhanced (urinary bladder)
Serpin family A member 5	P05154	SERPINA5	23.34 (22.86–24.34)	26.11 (24.62–26.71)	−2.77	0.00299	Tissue enhanced (adrenal gland, liver, testis)
Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	P42356	PI4KA	22.81 (21.58–23.46)	20.85 (20.43–21.29)	1.96	0.00299	Low tissue specificity
Antileukoproteinase	P03973	SLPI	29.09 (28.37–30.85)	31.87 (31.66–32.18)	−2.78	0.00567	Group enriched (cervix, salivary gland)
Stratifin	P31947	SFN	22.25 (20.94–23)	24.7 (23.61–25.3)	−2.45	0.00567	Group enriched (esophagus, skin, vagina)
Polymeric immunoglobulin receptor	P01833	PIGR	26.09 (25.25–27.66)	29.5 (28.89–29.86)	−3.41	0.00567	Tissue enhanced (intestine, salivary gland)

Table 2. Cont.

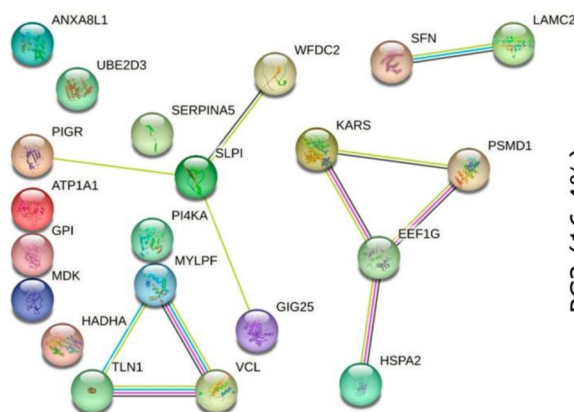
Protein	Uniprot ID	Gene Symbol	IUI	IVF	Log 2 Fold Change	Wilcox Test <i>p</i> -Value	Tissue Expression
Midkine	P21741	MDK	21.56 (21.19–23.06)	24.15 (23.88–24.52)	–2.59	0.00762	Tissue enhanced (ovary)
Complement factor D	Q6FHW3	DF	22.67 (21.52–23.63)	27.12 (23.95–27.79)	–4.45	0.01013	N/A
Heat shock-related 70 kDa protein 2	P54652	HSPA2	22.49 (21.58–23.44)	20.81 (20.43–21.49)	1.68	0.01013	Tissue enhanced (brain, skeletal muscle)
Elongation factor 1-gamma	P26641	EEF1G	25.04 (23.62–25.65)	21.2 (19.37–23.49)	3.84	0.01013	Low tissue specificity
FLJ00385 protein	Q8NF17	FLJ00385	28.94 (26.87–29.81)	26.31 (24.04–26.89)	2.63	0.01013	N/A
Cystatin C	A0A0K0K1J1	CSTS3	24.16 (23.61–25.99)	28.73 (27.02–28.83)	–4.57	0.01327	Tissue enhanced (brain)
Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3	A0A024RDH2	UBE2D3	24.12 (23.36–25.01)	21.1 (19.86–22.89)	3.02	0.01327	Low tissue specificity
Immunoglobulin delta heavy chain	P0DOX3	N/A	23.74 (22.24–27)	21.19 (20.28–21.82)	2.55	0.01327	N/A
Lysine-tRNA ligase	Q15046	KARS1	21.5 (20.19–22.1)	23.81 (21.76–24.82)	–2.31	0.01721	Low tissue specificity
Talin-1	Q9Y490	TLN1	22.05 (21.48–23.09)	23.87 (22.72–24.8)	–1.82	0.02202	Low tissue specificity
Myosin regulatory light chain 11	Q96A32	MYL11	22.61 (21–23.08)	20.21 (19.59–21.23)	2.4	0.02202	Group enriched (skeletal muscle, tongue)
Dermcidin	P81605-2	DCD	24.36 (22.79–27.5)	22.47 (21.57–23.03)	1.89	0.02202	Tissue enriched (skin)
Annexin A8-like protein 1	Q5VT79	ANXA8L1	22.27 (21.4–25.36)	20.01 (19.56–21.26)	2.26	0.02793	Group enriched (esophagus, skin, vagina)
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	P05023	ATP1A1	22.94 (22.24–23.32)	21.3 (21.09–22.28)	1.64	0.03499	Tissue enhanced (parathyroid gland)
Vinculin	A0A024QZN4	VCL	22.02 (21.77–22.82)	23.63 (22.4–24.42)	–1.61	0.04347	Low tissue specificity
Keratin 13	A1A4E9	KRT13	24.18 (23.3–24.74)	27.66 (26.01–28.76)	–3.48	0.04347	Tissue enhanced (esophagus, vagina)

Of the 29 proteins listed in Table 2, 23 were recognized by Metascape (Figure 3). Eight were annotated for negative regulation of endopeptidase activity (GO:0010951) with a $\log_{10} p$ value of -11.03 , while seven were annotated for involvement in neutrophil degranulation (R-HSA-6798695; $\log_{10} p$ value -7.30). No other annotation was assigned to more than four proteins in this group. Four protein–protein interactions were identified among the 29 proteins in an analysis performed using the String platform. The first interaction involved KARS, PSMD1, EEF1G, and HSPA2, all of which are factors influencing protein synthesis and degradation. The second involved WFDC2, SLPI, GIG25 (SERPINA3), and PIGR, which are a group of secreted proteinase inhibitors and an immunoglobulin receptor expressed in mucosal epithelial cells; these proteins were enriched in the IVF group. The third involved MYLPF (MYL11), TLN1 and VCL, which are cytoskeletal proteins involved in cellular adhesion and muscle contraction. The final interaction involved the extracellular matrix proteins SFN and LAMC2.

A Enrichment heatmap



B Protein-protein interaction



C PCA of differential proteins

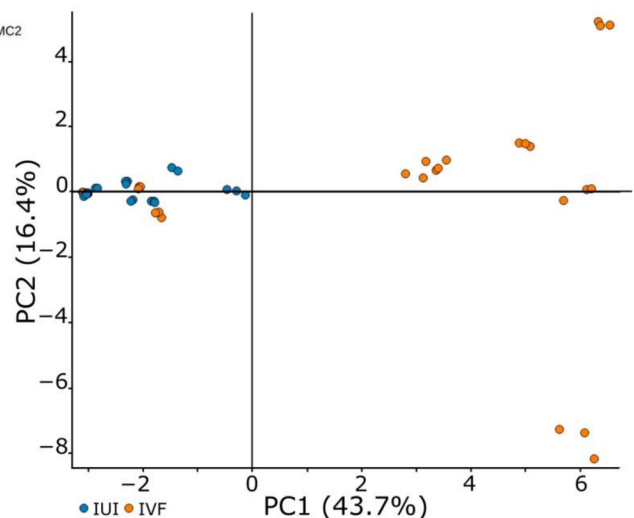


Figure 3. Annotation of proteins with Wilcoxon scores below 0.05. The biological annotations were used to generate an enrichment heatmap with Metascape (A) and to map protein–protein interactions (B). The PCA plot (C) shows the distribution of differentially expressed proteins with Wilcoxon p values below 0.05 in the IUI and IVF samples.

3. Discussion

This study was the first proteomic analysis of human cervical mucus describing differences in composition of cervical mucus sampled during the periovulation period from women undergoing a natural ovarian cycle (IUI group) versus those with synthetic estrogen-induced artificial cycle (IVF group). Although there were earlier efforts in the analysis of cervical mucus reported in 2007 [8,21,22], they identified much less proteins compared to our study (685, 194, and 147 in the studies of Shaw, Anders-Björkmann, and Tang, respectively). Panicker demonstrated an alternative approach in 2009 [9] by using SELDI-TOF to identify 30 protein peaks on average in a mass frame of 2.5–30 kDa. More recently, Grande investigated proteomic changes in the cervical mucus during the menstrual cycle [10] and changes in protein expression associated with endometriosis [11], resulting in the identification of 81 and 140 proteins, respectively. Additionally, Ma searched for protein biomarkers of cervical

adenocarcinoma in cervical mucus, identifying 711 proteins [23]. Proteomic analyses of cervical mucus have also been conducted in the context of veterinary medicine [24] and in studies on the cervical plug during pregnancy [25]. The most recent research in the field at the time of manuscript preparation was published by Leo Han, who identified 3048 proteins [26] in a comparative analysis of cervical mucus from humans and rhesus macaques. All of these studies used different approaches to various aspects of sampling and proteomics analysis and thus have different strengths and weaknesses when compared to this work, as we discuss below.

3.1. Model System for Cervical Mucus Evaluation

Previous analyses of cervical mucus were performed by collecting samples during spontaneous cycles, which made it impossible to precisely determine the time elapsed between ovulation and sampling; the average error was approximately one day [8–10]. The IUI sampling performed in this work had a similar level of accuracy, providing samples reflecting the basal composition of the cervical mucus during normal ovulatory cycles.

Nonetheless, our model system based on IVF/ICSI/ET (the IVF group) mimicked natural conception under standardized conditions but enabled sampling within a window of roughly 15 min around the time of ovulation. This accuracy was possible because the ovaries were monitored by ultrasound, the timing of ovulation was controlled by the application of exogenous hCG, and eggs were collected by ovum pick-up. Cervical mucus samples were acquired immediately prior to egg collection.

3.2. Cervical Mucus Sampling

Two main approaches to cervical mucus sampling were used in earlier studies. The first was to collect cervicovaginal fluid or lavage. This approach was used by Shaw [21], who analyzed cervicovaginal fluid obtained by inserting a gauze into the vagina for 1 h, and by Tang [22], who performed vaginal lavage with 5 mL of saline solution. Both approaches are straightforward and provide samples free from compounds that may interfere with subsequent processing. However, the obtained proteome is more of vaginal origin than cervical. The second approach involves extracting cervical mucus by suction with a thin catheter and was used by Andersch-Björkman [8], Grande [10,11], Han [26], and our group. This approach enables selective collection of cervical mucus with minimal contamination from other compartments of the female genitourinary tract. Finally, during regular gynecological examinations conducted [27] to prevent cervical cancer, cervical epithelia are commonly sampled together with fluid/mucus using a specialized brush. This approach was used by Panicker [9], but Andersch-Björkman [8] has stated that it results in relatively severe sample contamination with epithelial and blood cells.

3.3. Proteomic Approaches in Cervical Mucus Analysis

The viscosity of the cervical mucus varies with the phase of the menstrual cycle, and thus, samples must be dissolved in an appropriate solvent to facilitate further processing. Several approaches have been used for this purpose. Dissolution is most straightforward for samples of cervicovaginal fluid, which can be extracted from phosphate-buffered saline and cervicovaginal lavage and which can be processed directly. Both materials can then be centrifuged and submitted to downstream sample preparation. However, the processing of cervical mucus obtained by suction is more challenging. A relatively gentle dissolution method was reported by Grande [10,11], who used 0.2% trifluoroacetic acid followed by centrifugation at 9200× *g*. This approach introduces no compounds that could interfere with subsequent protein assays or digestions but that extract only a few of the proteins in the initial sample, as demonstrated by the comparatively small numbers of proteins identified in studies where the procedure was used. The second approach was used by Andersch-Björkman [8], Han [26], and our group. It involves moderately harsh conditions—a 4% SDS buffer was used in our experiments. Andersch-Björkman et al. bypassed the protein concentration assay by directly loading the dissolved mucus into an electrophoretic gel, while Ma [23] et al. used detergent concentrations similar to those used in our work in combination with a chaotropic reagent (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% SDS, 40 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA). This treatment was followed by acetone precipitation, dissolution of the precipitated proteins in 8 M urea/100 mM tetraethyl-ammonium bromide (TEAB), and iTRAQ metabolic labeling (which circumvented any need to perform a protein concentration assay).

It was difficult to identify a suitable concentration assay for use in this work because of issues with buffer compatibility. Quantitative mass spectrometry is essential for successful biomarker identification, and while many isotopically labeled approaches [28] have been proposed, we consider label-free quantification to be

preferable for highthroughput proteomics. We therefore needed to reliably control the amounts of proteins and peptides contained in samples submitted to processing and mass spectrometric analysis. Unfortunately, the composition of the FASP buffer that we used to solubilize mucus samples (4% SDS, 100 mM DTT) makes it incompatible with most colorimetric protein assays; the BCA assay tolerates detergents but is sensitive to reducing agents, while the opposite is true for the Bradford assay. We ultimately achieved acceptable results with the Thermo Scientific Pierce 660 nm protein assay using the ICDR reagent [29]. To evaluate the efficiency of the subsequent digestion step and to tune the number of peptides injected into the LC-MS system, we performed a standard BCA assay before peptide purification.

Because earlier studies on cervical mucus all used different sample preparation methods and mass spectrometric techniques, they also used different digestion and peptide purification strategies. Panicker [9] used SELDI-TOF, which requires a sample preparation strategy differing markedly from those needed in bottom-up proteomic analyses such as those conducted in the other cited studies. Conversely, Tang [22] used two-dimensional electrophoresis, Andersch-Björkman [8] and Shaw [21] used SDS-PAGE fractionation followed by gel spot/band excision and subsequent digestion. Shaw made this approach almost perfect, performing a series of general proteomics experiments and separate specialized experiments examining mucins and their glycosylation. Grande [10,11] and Ma [23] both used a gel-free approach involving direct in-solution digestion. Unfortunately, however, Ma provided only limited details of this process—the explanation regarding how harsh buffers were diluted before trypsin digestion was particularly sparse.

It has been reported that solution phase trypsin digestion is suboptimal in terms of efficiency and the removal of interfering compounds. Consequently, a range of alternative approaches have been developed to enable more effective digestion. One such approach that has achieved considerable popularity is filter-aided sample preparation (FASP), which was developed by Wisniewski [30]. We used this approach successfully in earlier studies [31] and during the initial phase of this work. We subsequently tested FASP optimization using Lys-C endopeptidase and found that the use of this enzyme significantly increased the number of peptides identified in samples, in accordance with the published claims [32]. A similar approach involving enhanced FASP modification [33] was used by Han [26]. While the capabilities of these two methods have not yet been compared directly, the available data suggest that they both perform well.

3.4. Cervical Mucus Proteome

As mentioned above, previous studies on cervical mucus proteomics identified 30–3048 proteins in 3–29 patients. Here, we report the identification of 4370 proteins in cervical mucus samples from 19 patients undergoing assisted reproduction with (IVF) or without (IUI) hormonal stimulation. The analysis of the full set of samples, representing both IUI and IVF groups, provided a couple of interesting findings. First, relatively few proteins were identified with high confidence in some samples, mainly from the IUI group. Further examination showed that the number of proteins that were quantified based on precise mass and retention time data exceeded the number identified through analysis of tandem mass spectra. Nevertheless, the number of quantified proteins in the IUI samples was consistently lower than in the IVF samples. Since the protein quantity injected into the mass spectrometer was identical in both cases, there are two possible explanations for this outcome. The first is that the cervical mucus of the women without hormone stimulation contained fewer but more abundantly expressed proteins than that from women receiving hormonal stimulation, which might contain some proteins that were expressed due to treatment with exogenous estrogens. Alternatively, the physicochemical properties of cervical mucus from women receiving hormonal stimulation might differ from that of women not receiving such stimulation due to differences in factors such as the water content or peptidoglycan matrix. Such differences could affect the permeability of the mucus for secreted proteins and hence its preferential enrichment with proteins of lower molecular mass. However, the results presented in Figure 2E,F suggest that the first hypothesis is more plausible. Aside from these differences and the identification of some proteins commonly enriched in IUI and IVF samples, the two sample groups were relatively similar, and the effect of protein size was not reflected in relative abundance. This is also demonstrated by the heatmap and PCA results shown in Figure 2.

Andersch-Björkmann [8] identified 195 proteins in cervical mucus, 97 of which were also identified in our study. Moreover, 32 of the 148 proteins identified by Tang [22] were detected in our samples. Grande has published two studies on the proteomics of cervical mucus. The first study [10] compared the protein composition of cervical mucus in different phases of the menstrual cycle and identified 109 proteins, of which 26 were also identified in our samples. Grande's second study focused on discovering endometrial biomarkers and identified 110 proteins that were also identified by us. However, a further 4261 proteins were identified in this work but not in Grande's study, and 94 proteins were identified by Grande but not by us. Similarly, when comparing our results to those of Han [26], we find that 1040 proteins were common to both datasets, but 3330 were found exclusively in our dataset and 2008 in Han's. Despite the different sampling procedures, clinical characteristics, instrumentation and protocols used in all these studies, the limited overlap between the sets of identified proteins (which exists even when comparing this work to older studies with few identifications) suggests that the composition of the cervical mucus is highly variable, and further standardization is needed for future diagnostic use. The "minimal" cervical mucus proteome consisting only of proteins identified in this work and all the earlier studies cited in this paragraph contain just nine proteins: A1BG, ALB, ANXA1, APOA1, HP, LCN2, LYZ, PFN1, and S100A9.

Biological annotation of the cervical mucus proteome revealed that 57% of the proteins identified in this work had an intracellular GO annotation (Figure 3). Moreover, 7 of the 20 ontology terms included in the enrichment heatmap for cervical mucus related to intracellular processes. This was interesting because some reports have described the cervical mucus in the ovulatory phase as a cell-free mucous liquid [34]. Our data are not necessarily incompatible with this statement because the presence of intracellular proteins is not direct proof of the presence of cells; it could instead indicate the presence of subcellular particles, exosomes, or just proteins released by cellular and epithelial turnover.

The primary function of the cervical mucus is to present a physical and immunity barrier to the passage of factors from the extra-uterine environment to the upper FRT while remaining semi-permeable to sperm cells during ovulation. The Metascape enrichment analysis presented here is consistent with this function because the enrichment heatmap of the 20 most probable processes associated with the identified proteins contained four immunity-related terms, and neutrophil degranulation (R-HSA-6798695) was found to be the process most likely to be involved in cervical mucus biology. The defensive function of the cervical mucus was also confirmed by the fact that 1178 of the 4370 proteins identified in this work were immunoglobulins and their fragments. This is consistent with previous reports [35–37]. The sub-group analysis of fertilization outcomes was not performed due to limited numbers of pregnant patients.

3.5. Differences between IUI and IVF

Earlier studies comparing IUI and IVF responses focused mainly on analyzing pregnancy outcomes [38–40], evaluating endometrial responses by measuring endometrium thickness [41], or investigating endometrial biology using electron microscopy, histochemical analysis of endometrial biopsies, or non-targeted proteomic analysis of endometrial fluid [42–44]. There have also been studies on changes in the cervical mucus (evaluated using the Insler score [2]) induced by hormonal hyperstimulation similar to that received by our IVF group [45]. Moreover, multiple studies have shown that hormonal contraception can cause changes in the properties of the cervical mucus [46,47], again based on the Insler score. However, to the best of our knowledge, only two studies have directly examined hormone-induced changes in the biological composition of the cervical mucus: AnderschBjörkmann [8] and Grande [10] both investigated the protein composition of the cervical mucus during different phases of the natural menstrual cycle.

Andersch-Björkmann [8] identified 195 proteins, 97 of which were also identified in our study. Their main interest lay in the mucins and the changes in their relative abundance over the menstrual cycle that cause the downregulation of mucins during the ovulation period. Their results showed that all mucins were more abundant in cervical mucus from women undergoing IVF, with MUC5AC and MUC16 having Wilcoxon scores below 0.05.

Grande [10] identified 38 proteins that were described as being constitutively expressed in all menstrual cycle phases. Twenty-five of these proteins were also identified in our samples, and three of them had *p* values

below 0.05 indicating differential expression; two were enriched in the IVF samples (WFDC2 and SLPI) and one in IUI (IGHG1). Moreover, 20 of the 42 proteins that Grande described as specific to the pre-ovulatory phase were detected in our ovulatory samples. Two proteins from this group (A2GL and DEFB1) were enriched in the IVF samples, and one (EF1A1) was enriched in the IUI group. Only 10 of the 38 proteins that Grande described as being specific to the ovulatory phase were detected in our samples. Two of these ten proteins, LOX12 and RBGP1, were enriched in the IVF group. In the post-ovulatory phase, we identified 7 out of 17 proteins, none of which were enriched in the IVF or IUI groups. These results show that better proteome coverage allowed us to detect proteins previously considered phase-specific in the ovulatory cervical mucus.

Our results also revealed significant differences in the protein content of cervical mucus from the IUI and IVF patient groups: 199 proteins were found to be enriched in IUI and 422 in IVF. According to ProteomeDiscoverer, the main ontology term associated with proteins enriched in the IUI samples and for those enriched in the IVF samples was “not characterized”. More informative results were obtained using Metascape, which indicated that the main ontology terms associated with proteins enriched in the IUI group were phosphatidic acid synthesis, negative regulation of responses to external stimuli, muscle contraction, and heart morphogenesis. The ontology terms associated with proteins enriched in the IVF samples were more similar to the annotations of the general proteome, although some differences were observed. In particular, the IVF group was associated with formation of the cornified envelope, endopeptidase activity, and neutrophil extracellular trap formation. In addition, 27% of the identified proteins were upregulated when comparing the IUI and IVF groups, while 46% were downregulated, suggesting differences in the immune properties of the cervical mucus under IUI and IVF conditions. This is consistent with the fact that the immune response in the FRT is known to be hormonally regulated [48] and our finding that immunoglobulins comprised roughly a quarter of the proteins identified in this work. Useful insights into the effects of IVF and hormonal changes more generally on the immune properties of the cervical mucus could potentially be obtained by comparing our results to those of an earlier study that measured the concentrations of interleukins and cytokines in endometrial fluid from women undergoing IUI and IVF [49]. However, directly comparing the results of these two studies might be difficult because the earlier study also showed that the levels of interleukins and cytokines in endometrial fluid differed substantially from those in cervical mucus. We have not found any other study focused on the description of CM composition after controlled ovarian hyperstimulation. The indirect evidence of how CM changes after hyperstimulation could be found in works from Insler [2], describing the changes of CM during the ovulatory cycle, and in Devroey [50] describing endometrium response to controlled ovarian hyperstimulation.

The method described here could be used in future biomarker discovery studies using CM as a non-invasive biological material. For that purpose, the protocol contains several quality-control steps allowing for data normalization and direct comparison of results: (i) in-depth clinical examination and standardized data collection and mining; (ii) precise timing of CM collection during (peri)ovulatory period; in the IVF, it is the time of ovum pick-up, while in the IUI it is the ultrasound-confirmed ovulation; (iii) standardization and quality assurance process in the laboratory analysis, which includes quantitative measurements of both proteins and peptides. This allows for normalization in the sample preparation and assures that the identical protein quantities are processed and the same number of peptides are subjected to the LC-MS analysis. The quality and accuracy of the LC-MS is assured by weekly calibration and maintenance and is monitored by injection of control BSA samples during the data acquisition. The data processing is performed using the LC-MS vendor’s software for the whole dataset in one batch, using normalization and imputation for subsequent statistical analyses.

The methodology reported here achieved, thus far, the most comprehensive results in proteomic analysis of the cervical mucus. Technically speaking, we have detected a similar or higher number of identified proteins using comparable protocols as in Han’s study [26]. Nonetheless, we have analyzed a much larger cohort of healthy and clinically well-characterized women to establish a reference cervical mucus proteome in the periovulatory period, which will be used in future studies to identify robust disease protein biomarkers.

4. Materials and Methods

The workflow for proteomic analysis of cervical mucus is shown in Figure 4.

4.1. Patient Criteria

The design of the “Biomarkers of endometrial receptivity (BIOMER, NCT04619524)” trial was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, and University Hospital in Olomouc. Patients at the IVF Unit of University Hospital Olomouc were assessed for eligibility and were invited to enroll in the study. The inclusion criteria were signing informed consent, an infertility diagnosis of male factor or unexplained, and a conception plan based on either (a) the natural ovulation cycle with IUI or (b) a stimulated IVF cycle using recombinant follicle-stimulating hormone (r-FSH), follitropin-alpha (Gonal-F, Merck Europe B.V., Amsterdam, The Netherlands) in combination with a gonadotropin-releasing hormone (*GnRH*) agonist (Diphereline, Ipsen Pharma, Boulogne-Billancourt, France) or antagonist (Cetrotide, Merck Europe B. V., Amsterdam, The Netherlands) as reported elsewhere [50,51].

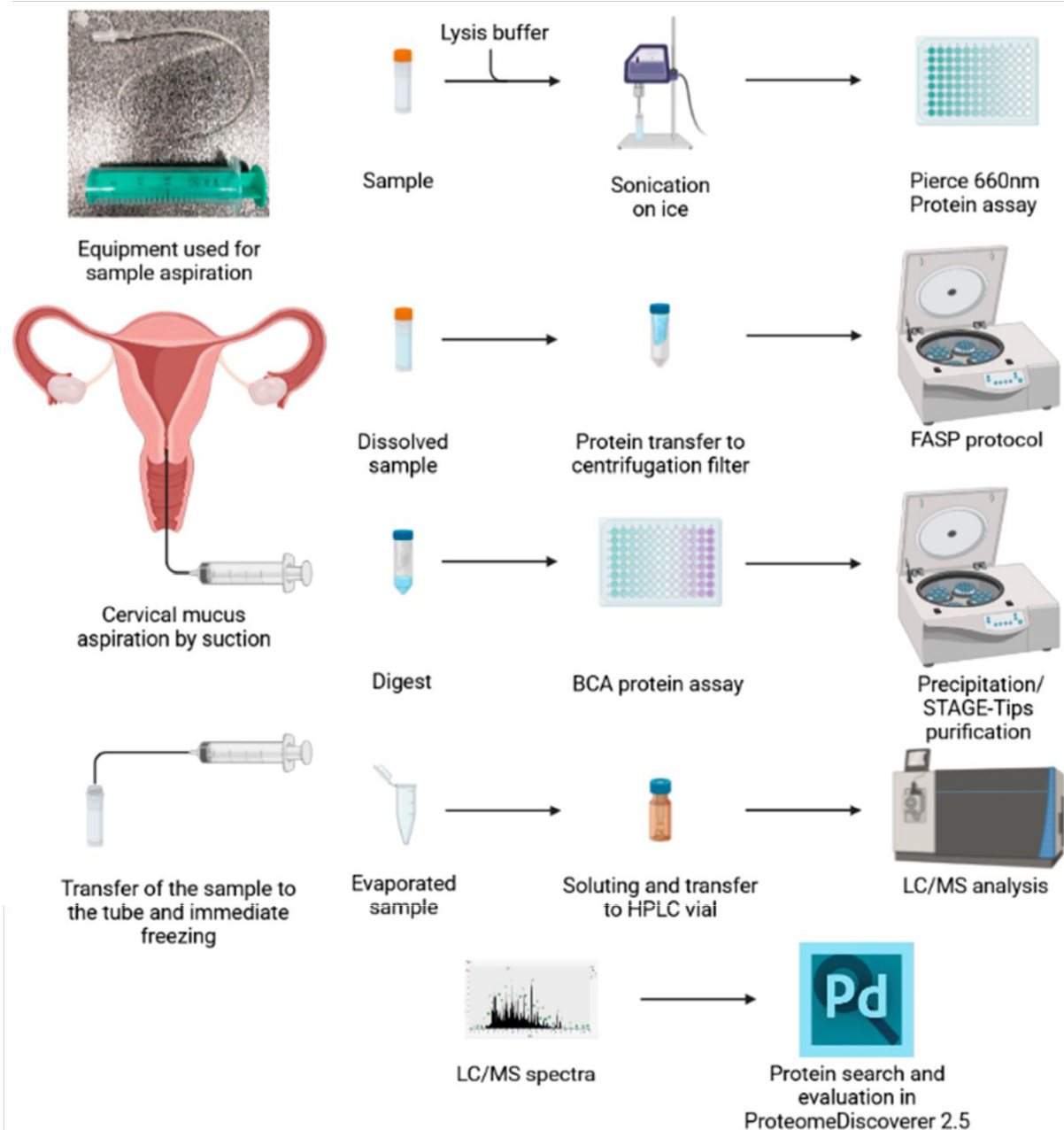


Figure 4. Schematic representation of the cervical mucus processing workflow. Cervical mucus is aspirated by suction using a neonatology umbilical cannula and an injection syringe and then flushed out to the screw tube, which is immediately frozen in liquid nitrogen. After thawing, the mucus is diluted, sonicated, and digested before LC-MS analysis. The figure was created using BioRender.com “www.biorender.com(accessed on 28 November 2022)”.

4.2. Sample Aspiration

In the IUI group, patient ovarian cycles were monitored by ultrasound, and IUI was performed during the periovulatory period. Cervical mucus sampling was performed by aspiration immediately before the IUI procedure using a CP-01 neonatal umbilical cannula (Gama Group, catalog no. V646958-ND) connected to a syringe. Samples were then transferred to screw cap tubes (SSlbio, catalog no. 2320-00), immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analyzed.

In the IVF group, all patients underwent controlled ovarian hyperstimulation (COH) for IVF/ICSI/ET; 4 patients were stimulated using the GnRH agonist long protocol [51] and 6 with the GnRH antagonist protocol [50]. After the dominant follicle reached 20 mm in diameter, a single injection of 7500 IU of human chorionic gonadotropin (Ovitrelle, Merck Europe B.V., Amsterdam, The Netherlands) was administered, and ovum pick-up was performed 36 h later. Cervical mucus sampling was performed just before ovum pick-up using an identical procedure as in the IUI group.

Patient data were collected in the electronic case report forms (ClinData; "www.clindata.imtm.cz(accessed on 22 November 2022)").

4.3. Sample Dilution

The samples were dissolved in 100 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 4% SDS, pH 7.6 (referred to in the text as FASP buffer) [30] and sonicated using a Sonopuls GM mini 20 (Bandelin, Berlin, Germany) needle sonicator for 1 min using a 1 s pulse/1 s pause sequence with an amplitude of 50% and an energy of 378 J per 1 mL. The protein content of the sonicated samples was then analyzed using the Pierce 660 nm protein assay [29] (Thermo Fisher, Rockford, USA catalog no. 22660) with ionic detergent compatibility reagents (IDCR, Thermo Fisher, catalog no. 22663) in accordance with the manufacturer's instructions.

4.4. Protein Digestion

Samples for proteomic analysis were subjected to filter-aided sample preparation (FASP) as described by Wisniewski [30]. Briefly, each sample was diluted in FASP lysis buffer, transferred to a filter unit (Merck Millipore, Carrigtwohill, Ireland, catalog no. MRCF0R030), mixed with UA buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 8 M Urea), and centrifuged. Unless otherwise indicated, centrifugation was always performed for 15 min at $13,000\times g$ and room temperature. The addition of UA buffer and the corresponding centrifugation step were repeated once. After washing, samples were alkylated with 0.05 M iodoacetamide by mixing for 1 min and then left to stand in darkness for 20 min. The samples were then centrifuged, the filtrate was removed, and the samples were washed twice with UA buffer and twice with 0.05 M ammonium bicarbonate (AmBiC). Digestion was performed using Trypsin/Lys-C mix (Promega, Madison, WI, USA, catalog nr. V5073) in 0.05 M AmBiC for 18 h at 37°C in a water bath. After digestion, the digest was centrifuged for 10 min at $13,000\times g$ and washed twice with 0.05 M AmBiC, with each wash being followed by centrifugation at $13,000\times g$ for 10 min. Digestion enzymes were used in a 1:100 ratio relative to the protein load. Finally, the peptide concentration of each digest was determined using the BCA protein assay.

4.5. Peptide Purification

Ten micrograms of peptides was purified using a two-step protocol. First, 1 mL of icecold acetone was added to peptide sample, followed by 20 s vortexing, 10 min of incubation at room temperature, and 10 min of centrifugation at $7000\times g$. After centrifugation, the supernatant was removed, and precipitated peptides were allowed to dry for 1 h. The dry sample was then dissolved in 0.05 M AmBiC and purified using STAGE Tips technology [52] with Styrene Divinyl Benzene reversed-phase sulfonate (SDB-RPS) sorbent. The 200 μL tip was fitted with three layers of Sigma SDB-RPS solid-phase extraction disks (3M, St. Paul, MN, USA, catalog No. 66886-U), and the tip was pressed through the punctured cap of a 2 mL Eppendorf tube. The sorbent in the assembled set was activated with acetonitrile, and the samples were mixed with 1% TFA in water and then with 1% TFA in ethyl acetate. The sample mixture was then loaded into the tip and centrifuged for 3 min at $2000\times g$, after which

the flow-through liquid was discarded. The tip with the sample was then washed with 1% TFA in ethyl acetate followed by 0.2% TFA in water, and the flow-through was discarded after each wash. Finally, after being transferred to a new tube, the peptides were eluted using 80% acetonitrile with 1% ammonia. The eluted samples were centrifuged at 2000× *g* for 3 min then vacuum dried and dissolved in 1% acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid prior to LC/MS analysis.

4.6. LC/MS Analysis

One microgram of peptide digest was injected and separated using a Dionex UltiMate 3000 liquid chromatograph (Thermo Scientific, Germering, Germany) and then subjected to MS analysis on a Thermo Orbitrap Exploris 480 instrument (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with the Easy-Spray ion source (Thermo Scientific, Malakka, Malaysia). The HPLC separation protocol consisted of desalting on an Acclaim PrepMap 100 column (100 μm × 2 cm, C18, 5 μm, 100 Å; Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) followed by pre-column and analytical separation on a PepMap RSLC column (75 μm × 25 cm, C18, 2 μm, 100Å; Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Sample loading and desalting was performed using the HPLC's loading pump at a flow rate of 6 μL/min 1% acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid. Ten minutes after loading, the column valve was switched, and separation was performed using a nanopump at a flow of 300 nL/min until the 95th minute with a gradient rising from 2% to 35% of mobile phase B. The mobile phases used for separation were 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). After minute 95, the column was cleaned for 10 min with 95% B and equilibrated with 2% B until minute 125, when the run ended.

The Thermo Orbitrap Exploris 480 was set to use the TopSpeed method with MS acquisition in the orbitrap with a resolution of 120,000 resolution and a mass range of 400–1500. Fragmentation was performed in an orbitrap with a resolution of 15,000 using HCD fragmentation and a 2 s time frame for fragmentation between MS scans. To assure quality control, samples of bovine serum albumin digest were injected and analyzed before and after each batch of experimental samples and at intervals of ten samples during the analysis of the batch.

4.7. Protein Search

Raw data processing, including peak list generation and protein searches, was performed using Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher Scientific). Peak lists from spectrum files were recalibrated against the Uniprot human database (www.uniprot.org; downloaded on 19 January 2021) with Trypsin (full) digestion and cysteine carbamidomethylation as a static modification. Peak lists were generated using the Spectrum Selector feature with MS1 precursor selection in the 400–5000 Da range and an intensity threshold of 2000 and FTMS as a mass analyzer. The main search was conducted using SequestHT and the UniProt human database (downloaded on 19 January 2021). A maximum of 2 missed cleavages was allowed, and the minimum and maximum peptide lengths were set to 6 and 144 amino acids, respectively. The precursor and fragment mass tolerances were set to 5 ppm and 0.3 Da, respectively. Methionine oxidation, N-terminal acetylation, and cysteine carbamidomethylation were selected as dynamic modifications. The validity of the search was verified using Percolator [53] with the Concatenated target/decoy strategy based on *q*-values. The maximum delta *C_n* was set to 0.05 and target FDRs were 0.01 and 0.05 for strict and relaxed criteria, respectively. Chromatographic properties were extracted using Minora Feature detection.

The consensus workflow started with the extraction of identified or quantified peptides from MSF Files. Feature Mapper was used for retention time alignment with a maximum window shift of 10 min and a minimum signal-to-noise ratio of 5. Precursor Ion Quantifier was used to calculate label-free quantification from unique peptides, considering protein groups and using shared quantification results. Precursor quantification was based on ion intensity. Protein abundance was calculated based on the Top 3 Average method. Normalization was set up in the Precursor Ion Quantifier using the Total Peptide Amount method. The second branch of the consensus workflow extracted data from MSF files and focused on peptide and protein validation. The first node in this branch was PSM Grouper with a Site Probability Threshold of 95. The succeeding Peptide Validator used Automatic Validation Mode with a Strict Target FDR of 0.01 and a Relaxed Target FDR of 0.05 for both PSMs and peptides. The validated peptides were processed using Peptide and Protein Filter with Peptide Confidence set to

At Least High and a minimum peptide length of 6 amino acids. Keep Lower confidence PSMs and Remove Peptides without Protein Reference were set to False. Protein Filters were set to the minimum number of 2 peptide sequences, counting only rank 1 peptides. The filtered proteins and peptides were then processed in three branches. The first branch led to Protein Scorer, branching to Protein FDR validator (set for Strict FDR 0.01 and relaxed FDR 0.05) and Protein Grouping using the Apply Strict Parsimony function. The second branch led to the Protein Annotation node, set to annotate Biological processes, Cellular Components and Molecular Functions using the same database as the protein search. The final branch led to the Protein Marker node.

All data generated in this work can be obtained via ProteomeXchange using the identifier PXD037654.

4.8. Quality Control Metrics

Quality control (QC) analyses of bovine serum albumin digests were processed using Skyline 21.2 (MacCoss Laboratories, Seattle, DC, USA; skyline.ms) [54] using BSA sequences obtained from Uniprot (13. 6. 2022) and reviewed manually. Quality control reports containing the Best Retention time, Total Area MS1, Max Height, Max FWHM (full width–half maximum of peak), and Average Mass Error PPM were then generated for the control samples. The stability of the analytical system was evaluated using the doubly charged peptide YICDNQDTISSK. The criteria for quality acceptance was retention time variability, FWHM and Total Area MS1 relative standard deviation below 15% commonly accepted in LC-MS practice.

For the Average Mass Error, we set a limit of 3 ppm internally.

4.9. Statistical Analysis

Initial statistical analyses were performed in Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmont, DC, USA). The list of identified proteins and peptides was exported to Excel, and identified peptides and proteins were extracted into a single data file containing only peptides identified with high confidence and proteins scored as Master. The counts of peptides and proteins were then averaged over files representing three technical replicates to obtain one value per biological sample. The resulting average values and standard deviations were recorded in a column graph. ProteomeDiscoverer 2.5 was used to perform principal component analysis (PCA) and to generate heatmaps based on normalized protein intensities. The parameters used for heatmap calculation were Scale before clustering, Squared Euclidean distances, and Complete linkage method.

For each sample and protein/peptide, abundance was calculated as the log₂ value of the median of the values obtained (from Proteome Discoverer) for three technical replicates or as the median value of the non-missing values (in case of non-imputed abundances). A protein/peptide was considered to be detected in a sample if its abundance was quantified at least in one technical replicate of that sample. Additional statistical analyses were performed using R, ver. 3.5.2 (Core Team, 2018). The statistical significance of differences in the abundances and detections of each protein/peptide between study groups was evaluated using Wilcoxon's exact test and Fisher's exact test, respectively. A *p* value below 0.05 was considered statistically significant.

4.10. Bioinformatics Analysis

The bioinformatics analysis consisted of multiple steps. The first step involved determining the biological process, cellular localization, and molecular function of identified proteins. Those protein annotations were performed using ProteomeDiscoverer 2.5 in the Protein annotation node in the Consensus workflow and were visualized using the same program.

Additional annotation of protein functions was performed using the Metascape web interface "metascape.org (accessed on 24 November 2022)" [19]. Uniprot protein IDs exported from ProteomeDiscoverer were uploaded to Metascape together with the Enrichment heatmap and Protein–Protein interaction annotations. The protein-protein interaction was calculated using String web interface [55]. Tissue expression profiles for proteins with Wilcoxon scores below 0.05 were obtained from the Human Protein Atlas database "www.proteinatlas.org(accessed on 9 September 2022)" [20].

5. Conclusions

In conclusion, our study defined the cervical mucus proteome thus far in the most comprehensive way. We also validated cervical mucus as a valuable non-invasive source of proximal fluid protein biomarkers and demonstrated the importance of clinical and laboratory standardization processes to enable reproducible measurement and its future use in clinical diagnostics of female reproductive tract disorders.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24021038/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, T.O., J.V. (Jan Vodic'kaand), J.D., P.D., R.P. and M.H.; Methodology, J.D., J.V. (Jan Vodic'kaand), T.O. and D.H.; Formal Analysis, T.O., J.V. (Jana Václavková), J.D. and P.K.; Investigation, J.D., J.V. (Jan Vodic'kaand), B.H., T.O. and D.H.; Resources, J.V. (Jan Vodic'kaand), J.D., M.J., O.M., V.D., P.H., K.S. and P.V.; Data Curation, T.O. and P.K.; Writing—Original Draft Preparation, T.O., J.V. (Jan Vodic'kaand), J.D., P.D. and M.H.; Writing—Review and Editing, P.D. and M.H.; Visualization, T.O. and J.V. (Jana Václavková); Supervision, M.H., R.P. and P.D.; Project Administration, P.D., R.P. and P.V.; Funding Acquisition, M.H., R.P. and P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant no. NV18-08-00291A. The authors acknowledge the use of services and technologies provided by the large research infrastructure EATRIS-CZ.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, was approved by the Ethics Committee of Faculty of Medicine Palacky University, and was registered as a clinical trial with the name “Biomarkers of endometrial receptivity (BIOMER, NCT04619524)”.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The mass spectrometry proteomics data have been deposited into the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [56] partner repository with the dataset identifiers PXD037654 and 10.6019/PXD037654.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Katz, D.F. Human Cervical Mucus: Research Update. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1991**, *165*, 1984–1986. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
2. Insler, V.; Melmed, H.; Eichenbrenner, I.; Serr, D.M.; Lunenfeld, B. The Cervical Score. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **1972**, *10*, 223–228. [[CrossRef](#)]
3. Van Kooij, R.J.; Roelofs, H.J.; Kathmann, G.A.; Kramer, M.F. Human Cervical Mucus and Its Mucous Glycoprotein during the Menstrual Cycle. *Fertil. Steril.* **1980**, *34*, 226–233. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
4. Bigelow, J.L.; Dunson, D.B.; Stanford, J.B.; Eochard, R.; Gnath, C.; Colombo, B. Mucus Observations in the Fertile Window: A Better Predictor of Conception than Timing of Intercourse. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2004**, *19*, 889–892. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
5. Rai, P.; Kota, V.; Sundaram, C.S.; Deendayal, M.; Shivaji, S. Proteome of Human Endometrium: Identification of Differentially Expressed Proteins in Proliferative and Secretory Phase Endometrium. *Proteom. Clin. Appl.* **2010**, *4*, 48–59. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
6. Salamsen, L.A.; Edgell, T.; Rombauts, L.J.F.; Stephens, A.N.; Robertson, D.M.; Rainczuk, A.; Nie, G.; Hannan, N.J. Proteomics of the Human Endometrium and Uterine Fluid: A Pathway to Biomarker Discovery. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 1086–1092. [[CrossRef](#)]
7. Sadler, T.W. *Langman's Medical Embryology*; Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 1995; ISBN 978-0-683-07489-5.
8. Andersch-Björkman, Y.; Thomsson, K.A.; Holmén Larsson, J.M.; Ekerhovd, E.; Hansson, G.C. Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle. *Mol. Cell. Proteom. MCP* **2007**, *6*, 708–716. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
9. Panicker, G.; Lee, D.R.; Unger, E.R. Optimization of SELDI-TOF Protein Profiling for Analysis of Cervical Mucous. *J. Proteom.* **2009**, *71*, 637–646. [[CrossRef](#)]
10. Grande, G.; Milardi, D.; Vincenzoni, F.; Pompa, G.; Biscione, A.; Astorri, A.L.; Fruscella, E.; De Luca, A.; Messina, I.; Castagnola, M.; et al. Proteomic Characterization of the Qualitative and Quantitative Differences in Cervical Mucus Composition during the Menstrual Cycle. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 1717–1725. [[CrossRef](#)]
11. Grande, G.; Vincenzoni, F.; Milardi, D.; Pompa, G.; Ricciardi, D.; Fruscella, E.; Mancini, F.; Pontecorvi, A.; Castagnola, M.; Marana, R. Cervical Mucus Proteome in Endometriosis. *Clin. Proteom.* **2017**, *14*, 7. [[CrossRef](#)]
12. Otani, S.; Fujii, T.; Kukimoto, I.; Yamamoto, N.; Tsukamoto, T.; Ichikawa, R.; Nishio, E.; Iwata, A. Cytokine Expression Profiles in Cervical Mucus from Patients with Cervical Cancer and Its Precursor Lesions. *Cytokine* **2019**, *120*, 210–219. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
13. Rocconi, R.P.; Wilhite, A.M.; Schambeau, L.; Scalici, J.; Pannell, L.; Finan, M.A. A Novel Proteomic-Based Screening Method for Ovarian Cancer Using Cervicovaginal Fluids: A Window into the Abdomen. *Gynecol. Oncol.* **2022**, *164*, 181–186. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
14. Finan, M.; Pannell, L.; Billheimer, D.; Schambeau, L.; Blandford, J.; Rocconi, R. A Novel Method of Screening for Endometrial Cancer. *Gynecol. Oncol.* **2012**, *125*, S165. [[CrossRef](#)]

15. Simsek, E.; Haydardedeoglu, B.; Hacivelioglu, S.O.; Cok, T.; Parlakgumus, A.; Bagis, T. Effect of Cervical Mucus Aspiration before Intrauterine Insemination. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* **2008**, *103*, 136–139. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
16. Massai, M.R.; de Ziegler, D.; Lesobre, V.; Bergeron, C.; Frydman, R.; Bouchard, P. Clomiphene Citrate Affects Cervical Mucus and Endometrial Morphology Independently of the Changes in Plasma Hormonal Levels Induced by Multiple Follicular Recruitment. *Fertil. Steril.* **1993**, *59*, 1179–1186. [[CrossRef](#)]
17. Marchini, M.; Dorta, M.; Bombelli, F.; Ruspa, M.; Campana, A.; Dolcetta, G.; Radici, E. Effects of Clomiphene Citrate on Cervical Mucus: Analysis of Some Influencing Factors. *Int. J. Fertil.* **1989**, *34*, 154–159.
18. Palomba, A.; Abbondio, M.; Fiorito, G.; Uzzau, S.; Pagnozzi, D.; Tanca, A. Comparative Evaluation of MaxQuant and Proteome Discoverer MS1-Based Protein Quantification Tools. *J. Proteome Res.* **2021**, *20*, 3497–3507. [[CrossRef](#)]
19. Zhou, Y.; Zhou, B.; Pache, L.; Chang, M.; Khodabakhshi, A.H.; Tanaseichuk, O.; Benner, C.; Chanda, S.K. Metascape Provides a Biologist-Oriented Resource for the Analysis of Systems-Level Datasets. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1523. [[CrossRef](#)]
20. Thul, P.J.; Åkesson, L.; Wiking, M.; Mahdessian, D.; Geladaki, A.; Ait Blal, H.; Alm, T.; Asplund, A.; Björk, L.; Breckels, L.M.; et al. A Subcellular Map of the Human Proteome. *Science* **2017**, *356*, eaal3321. [[CrossRef](#)]
21. Shaw, J.L.V.; Smith, C.R.; Diamandis, E.P. Proteomic Analysis of Human Cervico-Vaginal Fluid. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2859–2865. [[CrossRef](#)]
22. Tang, L.-J.; De Seta, F.; Odreman, F.; Venge, P.; Piva, C.; Guaschino, S.; Garcia, R.C. Proteomic Analysis of Human Cervical-Vaginal Fluids. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2874–2883. [[CrossRef](#)]
23. Ma, Z.; Chen, J.; Luan, T.; Chu, C.; Wu, W.; Zhu, Y.; Gu, Y. Proteomic Analysis of Human Cervical Adenocarcinoma Mucus to Identify Potential Protein Biomarkers. *PeerJ* **2020**, *8*, e9527. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
24. Maddison, J.W.; Rickard, J.P.; Bernecic, N.C.; Tsikis, G.; Soleihavou, C.; Labas, V.; Combes-Soia, L.; Harichaux, G.; Druart, X.; Leahy, T.; et al. Oestrus Synchronisation and Superovulation Alter the Cervicovaginal Mucus Proteome of the Ewe. *J. Proteom.* **2017**, *155*, 1–10. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
25. Lee, D.-C.; Hassan, S.S.; Romero, R.; Tarca, A.L.; Bhatti, G.; Gervasi, M.T.; Caruso, J.A.; Stemmer, P.M.; Kim, C.J.; Hansen, L.K.; et al. Protein Profiling Underscores Immunological Functions of Uterine Cervical Mucus Plug in Human Pregnancy. *J. Proteom.* **2011**, *74*, 817–828. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
26. Han, L.; Park, D.; Reddy, A.; Wilmarth, P.A.; Jensen, J.T. Comparing Endocervical Mucus Proteome of Humans and Rhesus Macaques. *Proteom. Clin. Appl.* **2021**, *15*, e2100023. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
27. Comparetto, C.; Borruto, F. Cervical Cancer Screening: A Never-Ending Developing Program. *World J. Clin. Cases* **2015**, *3*, 614–624. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
28. Rylova, G.; Ozdian, T.; Varanasi, L.; Soural, M.; Hlavac, J.; Holub, D.; Dzubak, P.; Hajduch, M. Affinity-Based Methods in Drug-Target Discovery. *Curr. Drug Targets* **2015**, *16*, 60–76. [[CrossRef](#)]
29. Antharavally, B.S.; Mallia, K.A.; Rangaraj, P.; Haney, P.; Bell, P.A. Quantitation of Proteins Using a Dye-Metal-Based Colorimetric Protein Assay. *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 342–345. [[CrossRef](#)]
30. Wis'niewski, J.R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 359–362. [[CrossRef](#)]
31. Ozdian, T.; Holub, D.; Maceckova, Z.; Varanasi, L.; Rylova, G.; Rehulka, J.; Vaclavkova, J.; Slavik, H.; Moudry, P.; Znojek, P.; et al. Proteomic Profiling Reveals DNA Damage, Nucleolar and Ribosomal Stress Are the Main Responses to Oxaliplatin Treatment in Cancer Cells. *J. Proteom.* **2017**, *162*, 73–85. [[CrossRef](#)]
32. Wis'niewski, J.R. Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 5438–5443. [[CrossRef](#)]
33. Erde, J.; Loo, R.R.O.; Loo, J.A. Enhanced FASP (EFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 1885–1895. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
34. Odeblad, E. The Discovery of Different Types of Cervical Mucus and the Billings Ovulation Method®. *Bull. Ovul. Method Res. Ref. Cent. Aust.* **1994**, *21*, 3–35.
35. Barrios De Tomasi, J.; Opata, M.M.; Mowa, C.N. Immunity in the Cervix: Interphase between Immune and Cervical Epithelial Cells. *J. Immunol. Res.* **2019**, *2019*, 7693183. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
36. Wang, Y.-Y.; Kannan, A.; Nunn, K.L.; Murphy, M.A.; Subramani, D.B.; Moench, T.; Cone, R.; Lai, S.K. IgG in Cervicovaginal Mucus Traps HSV and Prevents Vaginal Herpes Infections. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 1036–1044. [[CrossRef](#)]
37. Hein, M.; Petersen, A.C.; Helmig, R.B.; Ulbjerg, N.; Reinholdt, J. Immunoglobulin Levels and Phagocytes in the Cervical Mucus Plug at Term of Pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2005**, *84*, 734–742. [[CrossRef](#)]
38. Zheng, Y.; Li, Z.; Xiong, M.; Luo, T.; Dong, X.; Huang, B.; Zhang, H.; Ai, J. Hormonal Replacement Treatment Improves Clinical Pregnancy in Frozen-Thawed Embryos Transfer Cycles: A Retrospective Cohort Study. *Am. J. Transl. Res.* **2013**, *6*, 85–90.
39. De Sutter, P.; Veldeman, L.; Kok, P.; Szymczak, N.; Van der Elst, J.; Dhont, M. Comparison of Outcome of Pregnancy after Intra-Uterine Insemination (IUI) and IVF. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 1642–1646. [[CrossRef](#)]
40. Gekka, Y.; Nakagawa, K.; Watanabe, H.; Kuroda, K.; Horikawa, T.; Takamizawa, S.; Sugiyama, R. Comparison of Pregnancy Outcomes between Fresh Embryo Transfer in a Natural IVF Cycle and IUI Cycle Among Infertile Young Women. *J. Reprod. Infertil.* **2022**, *23*, 93–99. [[CrossRef](#)]
41. von Wolff, M.; Fäh, M.; Roumet, M.; Mitter, V.; Stute, P.; Griesinger, G.; Kohl Schwartz, A. Thin Endometrium Is Also Associated with Lower Clinical Pregnancy Rate in Unstimulated Menstrual Cycles: A Study Based on Natural Cycle IVF. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
42. Bourgain, C.; Devroey, P. The Endometrium in Stimulated Cycles for IVF. *Hum. Reprod. Update* **2003**, *9*, 515–522. [[CrossRef](#)]

43. Adams, S.M.; Terry, V.; Hosie, M.J.; Gayer, N.; Murphy, C.R. Endometrial Response to IVF Hormonal Manipulation: Comparative Analysis of Menopausal, down Regulated and Natural Cycles. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **2004**, *2*, 21. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
44. Li, M.-Q.; Jin, L.-P. Ovarian Stimulation for in Vitro Fertilization Alters the Protein Profile Expression in Endometrial Secretion. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2013**, *6*, 1964.
45. Han, L.; Padua, E.; Hart, K.D.; Edelman, A.; Jensen, J.T. Comparing Cervical Mucus Changes in Response to an Oral Progestin or Oestrogen Withdrawal in Ovarian-Suppressed Women: A Clinical Pilot. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care Off. J. Eur. Soc. Contracept.* **2019**, *24*, 209–215. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
46. Natavio, M.F.; Taylor, D.; Lewis, R.A.; Blumenthal, P.; Felix, J.C.; Melamed, A.; Gentzschlein, E.; Stanczyk, F.Z.; Mishell, D.R. Temporal Changes in Cervical Mucus after Insertion of the Levonorgestrel-Releasing Intrauterine System. *Contraception* **2013**, *87*, 426–431. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
47. Steward, R.; Melamed, A.; Granat, A.; Mishell, D.R. Comparison of Cervical Mucus of 24/4 vs. 21/7 Combined Oral Contraceptives. *Contraception* **2012**, *86*, 710–715. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
48. Wira, C.R.; Rodriguez-Garcia, M.; Patel, M.V. The Role of Sex Hormones in Immune Protection of the Female Reproductive Tract. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 217–230. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
49. Boomsma, C.M.; Kavelaars, A.; Eijkemans, M.J.C.; Amarouchi, K.; Teklenburg, G.; Gutknecht, D.; Fauser, B.J.C.M.; Heijnen, C.J.; Macklon, N.S. Cytokine Profiling in Endometrial Secretions: A Non-Invasive Window on Endometrial Receptivity. *Reprod. Biomed. Online* **2009**, *18*, 85–94. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
50. Devroey, P.; Aboulghar, M.; Garcia-Velasco, J.; Griesinger, G.; Humaidan, P.; Kolibianakis, E.; Ledger, W.; Tomás, C.; Fauser, B.C.J.M. Improving the Patient's Experience of IVF/ICSI: A Proposal for an Ovarian Stimulation Protocol with GnRH Antagonist Co-Treatment. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2009**, *24*, 764–774. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
51. Filicori, M.; Cognigni, G.E.; Arnone, R.; Carbone, F.; Falbo, A.; Tabarelli, C.; Ciampaglia, W.; Casadio, P.; Spettoli, D.; Pecorari, R. Role of Different GnRH Agonist Regimens in Pituitary Suppression and the Outcome of Controlled Ovarian Hyperstimulation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **1996**, *11* (Suppl. 3), 123–132. [[CrossRef](#)]
52. Rappsilber, J.; Ishihama, Y.; Mann, M. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 663–670. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
53. The, M.; MacCoss, M.J.; Noble, W.S.; Käll, L. Fast and Accurate Protein False Discovery Rates on Large-Scale Proteomics Data Sets with Percolator 3.0. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27*, 1719–1727. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
54. 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. Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. *Bioinform. Oxf. Engl.* **2010**, *26*, 966–968. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
55. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Nastou, K.C.; Lyon, D.; Kirsch, R.; Pyysalo, S.; Doncheva, N.T.; Legeay, M.; Fang, T.; Bork, P.; et al. The STRING Database in 2021: Customizable Protein-Protein Networks, and Functional Characterization of User-Uploaded Gene/Measurement Sets. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D605–D612. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
56. Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D.J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE Database and Related Tools and Resources in 2019: Improving Support for Quantification Data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442–D450. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



ČESKÁ GYNEKOLOGIE

Časopis české gynekologické a porodnické společnosti ČLS JEP

Vážený pan
MUDr. Jan Vodička
Porodnicko-gynekologická klinika
Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta
Univerzity Palackého Olomouc
I.P.Pavlova 6
779 00 Olomouc

Olomouc 10. 1. 2023

Vážený pane doktore,

potvrzujeme Vám tímto přijetí Vaší publikace „**Tissue Expression analysis of cervical mucus proteome**“ do časopisu Česká gynekologie.

S pozdravem

ČESKÁ GYNEKOLOGIE
prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D.
vedoucí redaktor
Porodnicko-gynekologická klinika
I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D.
vedoucí redaktor

Vedoucí redaktor

Prof. MUDr. Radovan Pilka, Ph.D.
e-mail: radovan.pilka@fnol.cz
tel.: +420 588 442 830

Zástupce vedoucího redaktora

MUDr. Jan Vodička
e-mail: jan.vodicka@fnol.cz
tel.: +420 588 443 178

Adresa:

Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

Analýza tkáňové exprese proteomu cervikálního hlenu

Tissue expression analysis of cervical mucus proteome

Vodička, J.¹, Dostál, J.¹, Holub, D.², Pilka, R.¹, Džubák, P.², Hajdúch, M.², Oždian, T.²

Afiliace autorů:

- 1 Klinika gynekologie a porodnictví, Fakultní nemocnice v Olomouci, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, Olomouc, Česko
- 2 Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, Olomouc, Česko

Korespondenční adresa:

Tomáš Oždian

Institute of Molecular and Translational Medicine

Lékařská fakulta

Univerzita Palackého v Olomouci

Hněvotínská 3

Olomouc

Czechia

Tomas.Ozdian@upol.cz

+420 585632145

Abstrakt

Cervikální hlen je viskózní kapalina fungující jako zátka děložního čípku. V cervikálním hlenu můžeme detekovat produkty endometriálních a cervikálních žláz. Cervikální hlen je dále obohacen transudátem pocházejícím z vejcovodů a proteiny pocházejících z vaječníků, peritonea a vzdálených tkání. Se zvyšující se hladinou ovariálních estrogenů se vlastnosti cervikálního hlenu mění tak, že umožňují snadnější odběr a zpracování. Z tohoto důvodu jsme vybrali skupinu 10 pacientek léčených kontrolovanou ovariální hyperstimulací pro *in-vitro*

fertilizaci v centru asistované reprodukce. Tato studie se zaměřuje na proteomickou charakterizaci cervikálního hlenu a na buněčnou a tkáňovou lokalizaci identifikovaných proteinů. Nejvíce intenzivními proteiny identifikovanými v cervikálním hlenu jsou muciny, ale bylo nalezeno také mnoho méně abundantních proteinů vnitrobuněčného původu. Analýza tkáňových expresí odhalila mnoho proteinů, které jsou kromě tkání ženských reprodukčních orgánů exprimovány také v jiných tkáních a mimo jiné také proteiny specifické pro varlata, játra, placentu, oční sítnici a mozeček. Tato studie dále potvrzuje vhodnost cervikálního hlenu jako zdroje proteomických biomarkerů nejen pro diagnostiku ženského reprodukčního traktu.

Klíčová slova: cervikální hlen, proteomika, tkáňové exprese.

Abstract

Cervical mucus is a viscous fluid functioning as a uterine cervix plug. In cervical mucus, we can detect the products of the endometrial glands and cervical glands. Cervical mucus is further enriched with transudate of Fallopian tube origin and expressed ovarian, peritoneal, and proteins of remote tissues. With increasing levels of ovarian estrogens, the properties of cervical mucus for possible collection and processing change appropriately. For these reasons, we chose a group of 10 patients treated in the center of assisted reproduction by controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization. Our study focuses on the proteomic characterization of cervical mucus and localizes the possible sources of the identified proteins. The most abundant proteins were extracellular proteins, mainly mucins; however, most of the identified proteins, present usually in lower quantities, were of intracellular origin. The tissue analysis revealed that proteins from female reproductive organs are also expressed in the other tissues, but also proteins specific to the testis, skeletal muscle liver, placenta, retina, and cerebellum. This study confirms the suitability and high potential of cervical mucus proteome analysis for biomarker studies.

Keywords: Cervical mucus, proteomics, tissue expression

Úvod

Cervikální hlen je glykoproteinový gel tvořený žlázami děložního krčku. Je složen z vody (90 – 98%), organických a anorganických látek, mucinů, polysacharidů, proteinů a lipidů¹. V roce 1970 popsal Insler možnosti použití cervikálního hlenu při určování periovulační periody pomocí snížení viskozity a zvýšené tažnosti v závislosti na zvýšené hladině estrogenu². V této fázi cyklu je viskozita hlenu snížena pro umožnění průchodu spermií. Cervikální hlen vykazuje parametry směsné tekutiny také proto, že děloha funguje jako svalově kontraktilní orgán a to nejen v období těhotenství a porodu. Děložní kontrakce ve formě peristaltických vln

umožněných architekturou svalové vrstvy myometria a závislých na hladině hormonů v průběhu menstruačního cyklu byly popsány Kunzem v roce 2002³. Během periovulační fáze napomáhá peristaltická aktivita dělohy průchodu spermií i vajíčka. Vzhledem ke kontraktilitě dělohy a díky relativní otevřenosti ženského reprodukčního traktu může být cervikální hlen obohacen také o proteiny secernované jinými tkáněmi. Toho lze využít, vzhledem k dostupnosti a nenáročnosti odběru cervikálního hlenu, při hledání potenciálních neinvazivních biomarkerů. V naší předchozí práci⁴ byl charakterizován cervikální hlen zdravých žen z hlediska proteinového složení a základních proteinových funkcí. Zajímavým zjištěním bylo nalezení velkého množství intracelulárních a imunitních proteinů. V této práci chceme s využitím bioinformatiky a porovnáním získaných výsledků se známými tkáňovými expresními profily rozšířit předchozí studii a zjistit tkáňový původ proteinů identifikovaných v cervikálním hlenu.

Materiál a metody

Charakteristika pacientek

Do studie byly zařazeny pacientky centra asistované reprodukce Fakultní nemocnice v Olomouci. Podmínkou zařazení byl podepsaný informovaný souhlas, řízená ovariální stimulace s cílem odběru oocytů, fertilizace a embryotransferu. Věk při odběru oocytů < 37 roků, BMI 19 – 29 kg/m², žádné genetické a /nebo endokrinní a/nebo metabolické a/nebo imunologické anebo onkologické onemocnění v anamnéze. Pacientky měly předpokládanou dobrou ovariální rezervou dle hormonálního profilu. Vyloučeny ze studie byly pacientky s nálezem strukturálních změn pánevních orgánů, a dále pacientky s prokázaným syndromem polycystických vaječnicků, pacientky s těžkou formou endometriozy (III.-IV. ASRM) a kuřačky, Vylučovacím kritériem byly opakované (> 2) potraty, délka sterility > 5 let a více jak dvě implantační selhání v předchozích léčebných IVF cyklech.

Odběr cervikálního hlenu

Všechny pacientky podstoupily řízenou ovariální stimulaci pro IVF/ICSI/ET. Dle standardů byla provedena gonadotropní stimulace ovarií s hypofyzární supresí analogy GnRh. Při dosažení optimální velikosti

vedoucí kohorty folikulů byl proveden triggering subkutánní aplikací 7500 IU choriového gonadotropinu. Odběr oocytů byl naplánován 36 hodin po jeho podání. Odběr cervikálního hlenu byl proveden bezprostředně před odběrem oocytů. Po inzerci poševních zrcadel v litotomické poloze byl neonatální pupečnickovou cévkou CP -01 (Gama Group, cat. No. V646958-ND) a stříkačkou aspirován cervikální hlen. Vzorky byly bezprostředně přeneseny do pejet se šroubovacím uzávěrem (SSIbio, katalogové číslo 2320-00) a zamrazeny. Údaje o pacientkách byly uloženy v interně vyvinuté databázi ClinData (k dispozici na adrese clindata.imtm.cz) vytvořené pro ukládání klinických informací o lidských vzorcích.

Příprava vzorků pro proteomickou analýzu

Vzorky cervikálního hlenu byly rozpuštěny a zpracovány dle publikovaného protokolu⁴ v 1 ml 100 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 4% SDS, pH 7.6 pufru a sonikovány jehlovým sonikátorem Bandelin sonopuls. Rozpuštěné vzorky byly zpracovány metodou multienzymové digesce na filtru (MED-FASP) dle Wisniewského⁵. Získané peptidy byly přečištěny metodou Stop and Go extrakce (STAGE tips)⁶, vysušeny ve vakuové centrifuze a rozpuštěny v 0,05% trifluoroctové kyselině ve vodě pro LC/MS analýzu.

LC/MS analýza

Jeden mikrogram připraveného peptidového digestu byl separován kapalinovým chromatografem Dionex UltiMate 3000 spojeným s hmotnostním spektrometrem Thermo Orbitrap Fusion skrze iontový zdroj Proxeon Easy-Spray. Nano-HPLC separace probíhala na předkoloně Acclaim PrepMap 100 (100 μm x 2 cm, C18, 5 μm , 100 Å) a analytické koloně PepMap RSLC (75 μm x 50 cm, C18, 2 μm , 100 Å). Nanášení vzorku probíhalo s použitím loadovací pumpy s průtokem 6 $\mu\text{l. min}^{-1}$ a použitím vody s 1% acetonitrilem a 0.05% trifluoroctovou kyselinou. Separace probíhala pomocí nanopumpy s průtokem 300 nL. min^{-1} a gradientem od 2% do 40% B do 125 minuty ze 165 minut celkové doby analýzy. Po 125. minutě následoval proplach pomocí 90% B a ekvilibrace 2% B po dobu 30 minut. Mobilní fáze byly voda s 0,1% mravenčí kyselinou (A) a acetonitril s 0,1% mravenčí kyselinou (B). Hmotnostní spektrometr byl nastaven v režimu data dependentní akvizice se sběrem fragmentačních dat po dobu 3s. Rozlišení orbitrapu bylo nastaveno na 120 000 a hmotnostní rozsah na 350 – 1500. Fragmentace spekter probíhala v lineární iontové pasti s HCD („Higher-energy C-trap dissociation“) aktivací.

Vyhledání proteinů a statistická analýza

Zpracování hrubých dat včetně generování seznamů píků a vyhledávání proteinů bylo provedeno v programu Thermo ProteomeDiscoverer 2.5 s nastavením popsáním dříve⁴. Základní statistické zpracování bylo kalkulováno v programech Thermo ProteomeDiscoverer 2.5 a Microsoft Excel.

Bioinformatická analýza

Bioinformatická analýza se skládala z několika kroků. V prvním kroku byla zjištěna buněčná lokalizace porovnáním identifikovaných proteinů proti databázi QuickGO (www.ebi.ac.uk/QuickGO). Pro stanovení možné tkáňové exprese proteinů jsme vybrali databázi Human protein atlas⁷, která obsahuje proteinové a transkriptomické expresní data pro soubor lidských tkání. Normalizované exprese (nTMP) byly získány ze stránky proteinatlas.org 9. 9. 2022. Výsledný soubor identifikovaných proteinů z našeho experimentu byl poté spojen s touto databází pomocí MS Excel na základě genového jména. Pro účely přímého porovnání exprese mezi tkáněmi jsme se rozhodli nTPM reaktivizovat tak, že byl vytvořen poměr mezi každou tkání v databázi a tkání, kde měl daný transkript nejvyšší expresi. To nám umožnilo posoudit tkáňovou expresi díky snadným cut-offům. V prvním experimentu jsme sledovali distribuci proteinů v jednotlivých tkáních seřazením relativních expresí od nejnižšího po nejvyšší a na základě zkušeností z tohoto experimentu jsme přistoupili k experimentu druhému. Pro všechny tkáně jsme vyexportovali pouze geny s relativní expesí rovnou 1 (tj. nejvyšší) a tyto proteiny jsme na základě zkušeností s databází dělili na konstitutivně exprimované (ve více než 10 ostatních tkáních přesáhla relativní exprese hladiny 0,3), skupinově obohacené (v méně než 10 ostatních tkáních přesáhla relativní exprese hladiny 0,3) a tkáňově specifické (v žádné další tkáni nepřesáhla relativní exprese hladiny 0,3).

Výsledky

Pacientky

Soubor tvořilo 10 pacientek vyhovující kritériím. Nezaznamenali jsme statisticky významné rozdíly ve věku, hmotnosti, ovariální rezervy a délce sterility u pacientek. Hlavními indikacemi pro léčbu IVF metodami

byly mužský faktor, tubární faktor a idiopatický faktor sterility. Průměrný počet oocytů získaných ve stimulaci byl 15 (7-21). Hladiny estradiolu v den triggeringu hCG byl v průměru 9600 pmol/l (2800 – 19330 pmol/l). Výška endometria byla v průměru 10,4 mm (9 – 14mm). U žádné z pacientek se nerozvinula časná forma ovariálního hyperstimulačního syndromu a u všech 10 byl proveden elektivní single embryo transfer vysoce kvalitní blastocysty. Ve skupině otěhotnělo 6 žen, četnost těhotenství 60 %. Charakteristika pacientek je shrnuta v tabulce 1.

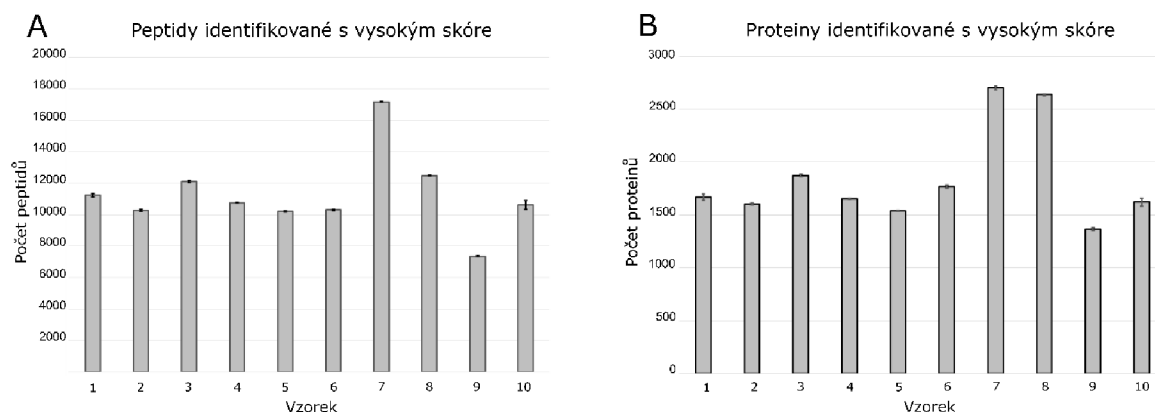
Tabulka 1: Charakteristika souboru pacientek.

Parametry	Pacient										Průměr	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Věk (roky)	33	29	34	33	33	29	29	33	31	28	31,2	2,3
BMI (kg/m ²)	21	22	20	22	20	23	20	20	21	20	20,9	1,1
FSH ve třetí den(IU/L)	4,9	5	6,7		6,5	7,4	5	7,5	5,4		6,1	1,1
Počet porodů	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0,2	0,4
Počet spontánních potratů	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,1	0,3
Délka neplodnosti (roky)	2	2	4	4		1	3	2	1	3	2,4	1,1
Počet selhaných předchozích čerstvých a/nebo mražených embryotransferů	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Důvod neplodnosti	i	a	i	i	a	i	i	i	t	i		
Hladina estradiolu v den podání hCG (pmol/L)	9571	11410	10161	3018	10462	14124	2865	3414	12214	19330	9656,9	5304,3
Endometrium v den podání hCG (mm)	9	14	9	10	9	9	10	10	14	10	10,4	2,0
Počet získaných oocytů	12	16	20	9	23	14	7	7	17	21	14,6	5,8

LC/MS

Při LC/MS analýze jsme analyzovali deset patientských vzorků ve třech technických replikátech. S použitím programu ProteomeDiscoverer 2.5 jsme identifikovali 25521 peptidových skupin v celém souboru a průměrně 11265 ± 2362 peptidů na vzorek (obrázek 1A). Z těchto peptidů bylo složeno v průměru 1847 ± 430

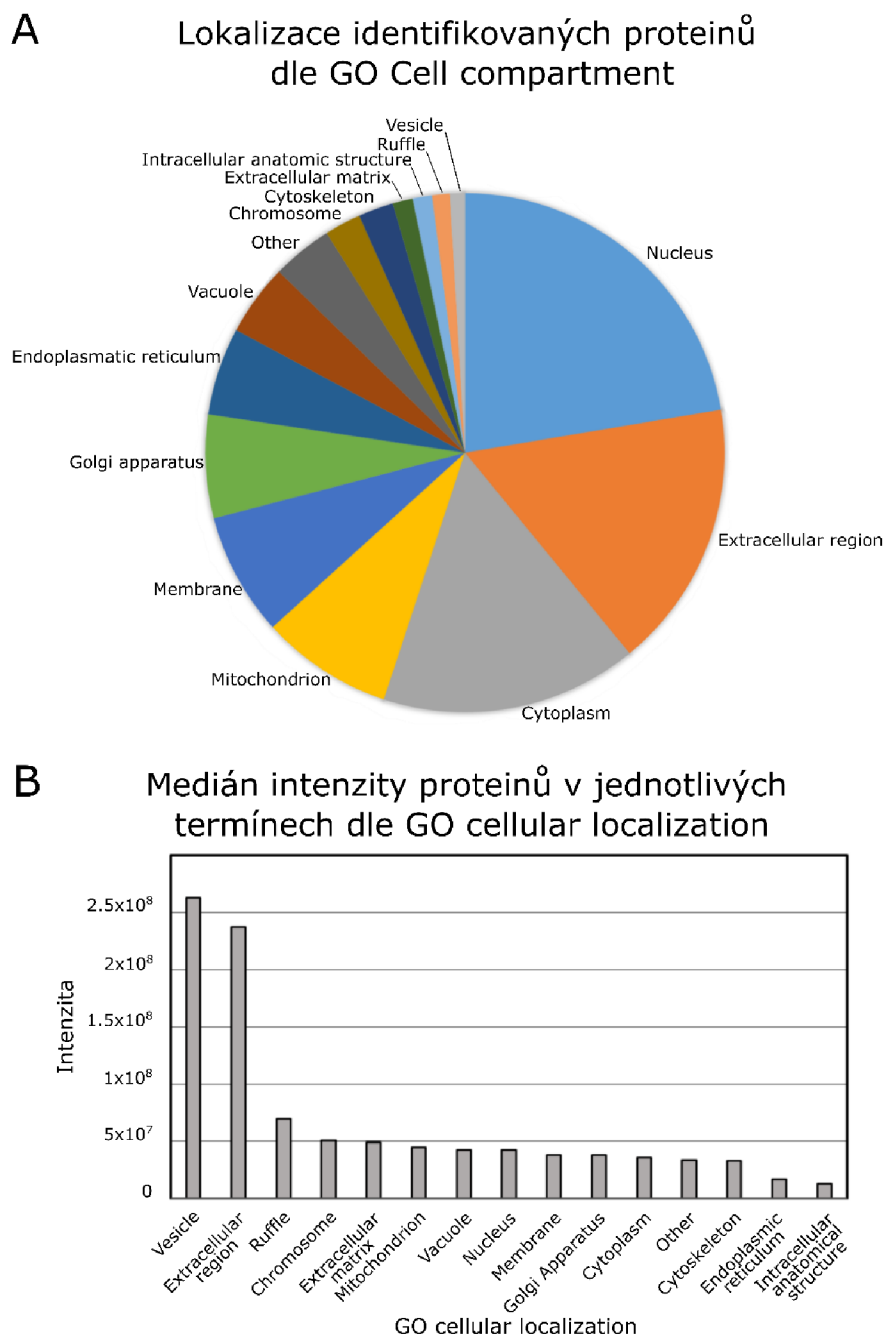
proteinů na vzorek a celkem 4486 unikátních proteinů s vysokým hodnocením. Hmotnostně spektrometrická data a výsledky vyhledávání jsou dostupné na dotaz autorům.



Obrázek 1: Proteomická charakteristika analyzovaného souboru. V grafu (A) jsou porovnány počty peptidů identifikovaných v jednotlivých vzorcích jako průměr ze tří technických replikátů \pm směrodatná odchylka. V grafu (B) jsou stejným způsobem prezentovány počty proteinů identifikovaných v jednotlivých vzorcích.

Lokalizace proteinů v buněčných organelách

Analýza vnitrobuněčné lokalizace proteinů byla provedena na základě složky „cellular localization“ databáze Gene Ontology (GO). Abychom mohli poskytnout přehlednou vizualizaci, ponechávali jsme u každého proteinu jen hesla položená nejvýše na úrovni organel. Výsledkem této analýzy bylo stanovení 22,3% proteinů s jadernou lokalizací, 16,7% extracelulární a 16% cytoplasmickou (Obrázek 2). Zbytek organel byl zastoupen s četností pod 10%, jako například mitochondrie s 8,2% nebo membrány se 7,7%. Tato analýza poskytuje ale informaci o četnosti proteinů v jednotlivých organelách a nezohledňuje intenzitu jednotlivých proteinů. Při zahrnutí mediánu intenzity identifikovaných proteinů pro jednotlivé organely vypadá celkový obraz trochu jinak (obrázek 2B) a zobrazuje extracelulární a sekretované proteiny jako více intenzivní a intracelulární organely s podobnou, ale celkově nižší intenzitou.



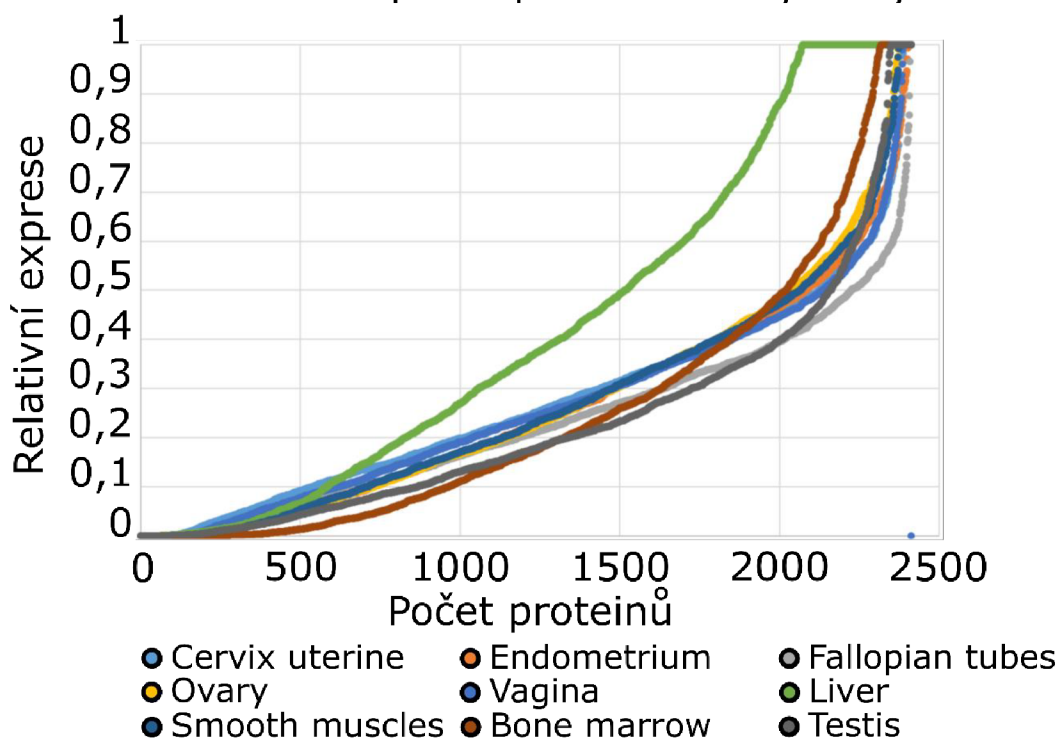
Obrázek 2: Analýza buněčných komponent dle Gene Ontology (GO) zastoupených mezi proteiny identifikovanými v cervikálních hlenech. Obrázek (A) poskytuje procentní zastoupení jednotlivých organel v proteomu a obrázek (B) přidává informaci o mediánu intenzity proteinů v těchto organelách zastoupených. Z důvodu kompatibility s databází jsou názvy buněčných komponent ponechány v původním znění.

Tkáňová lokalizace identifikovaných proteinů

Jedna z výzkumných otázek byla, odkud pocházejí proteiny identifikované ve vzorcích z cervikálního hlenu. Pro tento účel jsme našli vhodnou databázi, Human Protein Atlas⁷ (proteinatlas.org). Tato databáze obsahuje transkriptomická expresní data jednotlivých genů v různých tkáních. Architektura databáze je nastavena

pro porovnání exprese jednotlivých genů mezi tkáněmi na jednotlivé úrovni a nikoliv ve větším měřítku. Proto jsme se souhlasem Dr. Oksvolda přistoupili k relativizaci vstupních dat a umožnění takového porovnání i na úrovni proteomu. Výsledkem první aproximace ve zpracování těchto výsledků je distribuce relativní exprese proteinů ve zvolených tkáních (obrázek 4). V tomto obrázku je distribuce relativních proteinových expresí ve zvolených tkáních, jejichž produkty můžeme očekávat v cervikálním hlenu.

Distribuce relativní exprese proteinů ve vybraných tkáních



Obrázek 3: Distribuce relativní genové exprese ve vybraných tkáních. Distribuční graf ukazuje u většiny vybraných tkání velmi málo vysoce exprimovaných proteinů, většina proteinů je exprimována na střední úrovni a okolo 20% proteinů má relativní exprese pod 0,1, kterou považujeme za hranici, že protein je pravděpodobněji exprimován v jiné tkáni. Z důvodu kompatibility s databází jsou názvy tkání ponechány v původním znění.

Z distribučního grafu vyplývá, že v zájmových tkáních bylo exprimováno jen málo proteinů na vysoké úrovni. Jedinou výjimkou byla játra, kde maximální exprese mělo 14% proteinů. V děložním čípku mělo maximální exprese 2,2% proteinů, v endometriu 2,4% proteinů, ve vejcovodech 0,7% proteinů, ve vaječnicích 3,9%, ve vagině 2,5%, v hladkých svalech 1,5%, v kostní dřeni 3,9% a ve varlatech 2,6% proteinů s maximální exprese. Na druhou stranu jsme identifikovali 22,4% proteinů s relativní exprese pod 0,1 u tkání děložního krčku,

28,9% v endometriu, 28,9% ve vejcovodech, 30,2% ve vaječnících, 25,5% ve vagině, 8,5% v játrech, 11,4% v hladkých svalech, 18,9% v kostní dřeni a 9,9% ve varlatech. Relativní exprese pod 0,1 naznačuje, že tyto proteiny byly s největší pravděpodobností tvořeny někde jinde.

Výsledky z obrázku 3 naznačují, že většina proteinů identifikovaných v cervikálním hlenu patří buďto ke konstitutivně exprimovaným proteinům, nebo že mohou být sekretovány v jiných tkáních v souladu s hlavní hypotézou, že cervikální hlen je směsná tekutina obohacená o sekrece z jiných orgánů. Abychom byli schopni tyto jiné orgány identifikovat, exportovali jsme do tabulky 2 všechny proteiny, které měly v dané tkáni relativní expresi 1 – tedy byly zde nejvíce exprimované.

Tabulka 2: Počet specifických proteinů identifikovaných pro rozdílné tkáně. V prvním sloupci jsou počty proteinů s maximální relativní expesí v dané tkáni. V druhém sloupci jsou proteiny obohacené ve skupině tkání a v posledním sloupci jsou proteiny specifické pro konkrétní tkáň. Z důvodu kompatibility s databází jsou názvy tkání ponechány v původním znění.

Tkáň	Počet proteinů s maximální expesí	Počet skupinově specifických proteinů	Počet tkáňově specifických proteinů
Adipose tissue	141	46	0
Adrenal gland	156	34	5
Amygdala	30	7	3
Appendix	47	23	0
Basal ganglia	174	63	2
B-cells	34	9	0
Bone marrow	654	97	21
Breast	127	33	10
Cerebellum	734	185	32
Cerebral cortex	813	341	8
Cervix uterine	83	25	2
Colon	33	15	0
Corpus callosum	149	21	0
Dendritic cells	97	18	2
Ductus deferens	52	19	0
duodenum	31	8	0
Endometrium	82	15	0
Epididymis	144	49	13
Esophagus	185	72	1
Fallopian tubes	92	53	2
Gallbladder	63	21	4
Granulocytes	367	124	11
Heart muscles	223	91	26

Hippocampal formation	22	13	0
Hypothalamus	10	4	1
Kidney	168	83	17
Liver	794	232	156
Lung	154	41	4
Lymph nodes	130	23	0
Midbrain	79	13	1
Monocytes	60	21	0
NK cells	12	1	0
Ovary	208	29	1
Pancreas	375	99	17
Parathyroid gland	340	71	18
Pituitary gland	275	70	15
Placenta	359	148	56
Pons and medulla	94	36	2
Prostate	39	18	4
Rectum	30	13	0
Retina	132	57	46
Salivary gland	176	74	23
Seminal vesicle	104	39	0
Skeletal muscle	1289	435	192
Skin	233	99	30
Small intestine	305	143	0
Smooth muscles	134	28	0
Spinal cord	121	26	0
Spleen	216	72	2
Stomach	38	18	2
T-cells	76	25	2
Testis	1320	431	433
Thalamus	15	2	0
Thymus	15	0	0
Thyroid gland	140	57	6
Tongue	60	49	7
Tonsil	73	31	0
Total PBMC	84	27	0
Urinary bladder	26	15	0
Vagina	93	39	3

Z dat v tabulce 2 vyplývá, že průměrně 205 proteinů identifikovaných v cervikálním hlenu mělo maximální expresi v každé tkáni. Na základě manuálního průzkumu databáze proteinatlas.org a souboru proteinů použitého pro výpočet byly určeny tři hlavní typy proteinů, které se v databázi vykytují: Proteiny, které jsou exprimovány konstitutivně a jejich maximální exprese v kterékoliv tkáni je dílem statistiky, protože v ostatních tkáních se vyskytují v podobné míře. Proteiny, které se vyskytují ve skupině tkání s podobnými vlastnostmi a proteiny, které jsou exprimovány specificky v jedné tkáni a v ostatních minimálně. Proto jsme stanovili kritéria popsaná

v metodice pro odlišení těchto skupin a dále se zaměřili primárně na tkáňově specifické proteiny, protože nám o přítomnosti proteinů pocházejících z jiných tkání než ženských reprodukčních orgánů mohou napovědět nejvíce.

Jak je v tabulce 2 znázorněno, nejvíce tkáňově specifických proteinů nebylo pozorováno v orgánech ženských reprodukčních orgánů. Nejvíce tkáňově specifických proteinů bylo pozorováno s původem ve varlatech (433 proteinů), kosterních svalech (192 proteinů) a játrech (156 proteinů). V menší míře jsme našli proteiny specifické pro placentu (56 proteinů), oční sítnici (46 proteinů) a mozeček (32 proteinů). Z ženských reprodukčních orgánů byly v analyzovaném souboru nalezeny 3 proteiny specifické pro vaginu, 2 proteiny specifické pro děložní krček, 2 proteiny specifické pro vejcovody a 1 protein specifický pro vaječníky.

Diskuze

Hlavním cílem této studie bylo zjistit, které další tkáně přispívají k proteinovému složení cervikálního hlenu. Pro tyto účely jsme provedli celkem dvě analýzy. Oproti předchozí studii⁴ jsme rozšířili analýzu buněčných komponent a porovnali jsme získané výsledky s databází transkriptomických expresí proteinů v jednotlivých tkáních. Detailní analýza buněčné komponenty nepřinesla nová zjištění v poměru intracelulárních proteinů vůči proteinům sekretovaným. Kvantitativní analýza jednotlivých komponent ale potvrdila, že sekretovaných proteinů je méně druhů, ale jsou intenzivněji zastoupené. Na základě analýzy tkáňových expresních profilů jsme zjistili, že většina proteinů identifikovaných v cervikálním hlenu patří mezi konstitutivně exprimované a proteinů tkáňově specifických pro orgány ženského reprodukčního bylo identifikováno minimum. Nejvyšší množství tkáňově specifických proteinů jsme našli pro varlata (433 proteinů). Jejich předpokládaným zdrojem jsou spermie a ejakulát pronikající do cervikálního hlenu postkoitálně. Ejakulát jako komplexní směs sekretů pochází z varlat, semenných váčků a přídatných žláz působí jako výživné, transportní a pufrovací medium s alkalickým pH, které definuje hlavní funkci sekretu: ochranu spermií před kyselým poševním prostředím, metabolickou podporu spermií a zkapalnění⁸. Experimenty na modelech hlodavců demonstrují klíčovou úlohu ejakulátu pro implantaci embrya a optimální vývoj placenty. Semenná tekutina podporuje migraci leukocytů a tvorbu regulačních Th buněk, které usnadňují implantaci embrya potlačením zánětu, napomáhá adaptaci endometriálních arteriol a udržuje toleranci fetálních antigenů⁹. Tyto biologické mechanismy mohou v klinickém významu podpořit vyšší pravděpodobnost otěhotnění v IVF/ET cyklech, ve kterých dojde během stimulace ovarií k pohlavnímu styku

s ejakulací do pochvy¹⁰. Je obtížné vysvětlit zastoupení většího množství proteinů specifických pro kosterní svalstvo (192 proteinů). Děloha a pochva jsou tvořeny hladkou svalovinou. Přítomnost proteinů původem hladkého svalstva v našem souboru je však nižší. Pro náš nálezn mohou existovat tři vysvětlení: první je, že databáze není zcela dokončena a proteiny popisované jako specifické pro kosterní svalstvo by bylo možné v budoucnu vidět i v hladkém svalstvu. Druhé vysvětlení je, že se proteiny kosterního svalstva mohou v cervikálním hlenu vyskytovat, doposud však nebylo žádné podobné zjištění publikováno. Posledním vysvětlením může být, že se jedná o artefakt vzniklý při odběru nebo zpracování vzorků. I zde se jedná o chabé vysvětlení, neboť kontaminace při odběru by pocházely z cervikálního a vaginálního epitelu a kontaminace při zpracování z kůže a vlasů.

Další tkáň s vysokým zastoupením specifických proteinů byla játra (156 proteinů). V játrech je produkováno velké množství plasmatických proteinů¹¹ a současně v ženském reprodukčním traktu probíhá řada imunitních reakcí. Jsou zprostředkovány proteiny a cytokiny imunitního systému. Většina těchto proteinů v cervikálním hlenu je jaterního původu¹².

Přítomnost placentárních proteinů v cervikálním hlenu popsal Pockley v roce 1989¹³, který prokázal, že placentární proteiny působí supresivně. Tyto imunosupresivní faktory v cervikálním hlenu mohou chránit spermie a embryo v potenciálně hostilním prostředí ženského reprodukčního traktu. Je známo, že moduly spojené s imunitou jsou často exprimovány společně. Hees (2020) potvrdili imunitní moduly v mnoha tkáních, jako jsou játra, kora ledvin, plíce, děloha, podkožní tuk a viscerální omentum. Tento koncept může vysvětlovat vysokou tkáňovou expresi placentárních proteinů v cervikálním hlenu¹⁴.

Posledními tkáněmi s vysokým zastoupením specifických proteinů v cervikálním hlenu byla oční sítnice a mozeček. Přítomnost proteinů z těchto tkání by se dala vysvětlit jednoduše – v databázi nejsou proteiny periferních nervů ani nervů reprodukčního systému vedeny samostatně. Děloha je bohatě inervovaným orgánem. Je inervována četnými senzoryckými, parasympatickými, sympatickými a peptidergními neurovláknými. Jejich distribuce je ve stromatu a kolem cévních stěn, ve vrstvách myometria a endometria. Imunohistochemická studie prokázala lokalizaci a kvantitativní distribuci neuronálních vláken ve fundu, těle a děložním čípku mladých žen ve fertilním věku¹⁵. Ženský reprodukční systém je úzce závislý na hormonální stimulaci. Nicméně autonomní

inervační systém spolu s hormonální regulací je úzce provázán v regulaci fyziologických procesů v ženském reprodukčním traktu¹⁶. Tato skutečnost by mohla vysvětlit vysoký podíl peptidů neuronálního původu v naší studii. Protože v databázi nejsou nervy přítomné v děloze zavedeny, mohou mít nervově specifické proteiny falešně pozitivní lokalizaci v jiných nervových tkáních.

Souhrn

V této studii jsme provedli analýzu proteomických dat se zaměřením na tkáň jejich možné exprese. Analýza tkáňové exprese dle proteinatlas.org nebyla podle naší literární rešerše v podobném měřítku provedena. Nejvíce tkáňově specifických proteinů však bylo pozorováno z jiných tkání než z ženských reprodukčních orgánů. To může naznačovat nízkou unikátnost proteinů sekretovaných do cervikálního hlenu.

Střet zájmů

Autoři této práce nejsou ve střetu zájmů.

Dedikace

Tato práce byla podpořena z prostředků Agentury pro zdravotnický výzkum České Republiky (NV-18-08-00291), Evropským fondem pro regionální rozvoj - Projekt ENOCH (Č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), a EATRIS plus (871096) a Národním ústavem pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102, poskytovány Evropskou Unií - Next Generation EU)

Hmotnostně spektrometrická a ostatní proteomická data jsou přístupná na vyžádání u autorů.

Citace

- (1) Crha, K.; Ventruba, P.; Zakova, J.; Jeseta, M.; Pilka, R.; Vodicka, J.; Crha, I. Cervical mucus and its role in reproduction. *Ceska Gynekol.-Czech Gynaecol.* 2020, 85 (5), 333–338.
- (2) Inslar, V.; Melmed, H.; Eichenbrenner, I.; Serr, D. M.; Lunenfeld, B. The Cervical Score. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 1972, 10 (6), 223–228. <https://doi.org/10.1002/j.1879-3479.1972.tb00857.x>.
- (3) Kunz, G.; Leyendecker, G. Uterine Peristaltic Activity during the Menstrual Cycle: Characterization, Regulation, Function and Dysfunction. *Reprod. Biomed. Online* 2002, 4 Suppl 3, 5–9. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(12\)60108-4](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(12)60108-4).
- (4) Oždian, T.; Vodička, J.; Dostál, J.; Holub, D.; Václavková, J.; Ješeta, M.; Hamerníková, B.; Kouřilová, P.; Malchar, O.; Dvořák, V.; Hejtmánek, P.; Sobková, K.; Ventruba, P.; Pilka, R.; Džubák, P.; Hajdúch, M. Proteome

Mapping of Cervical Mucus and Its Potential as a Source of Biomarkers in Female Tract Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24 (2), 1038. <https://doi.org/10.3390/ijms24021038>.

(5) Wiśniewski, J. R. Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Anal. Chem.* 2016, 88 (10), 5438–5443. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00859>.

(6) Rappsilber, J.; Ishihama, Y.; Mann, M. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Anal. Chem.* 2003, 75 (3), 663–670. <https://doi.org/10.1021/ac026117i>.

(7) Thul, P. J.; Åkesson, L.; Wiking, M.; Mahdessian, D.; Geladaki, A.; Ait Blal, H.; Alm, T.; Asplund, A.; Björk, L.; Breckels, L. M.; Bäckström, A.; Danielsson, F.; Fagerberg, L.; Fall, J.; Gatto, L.; Gnann, C.; Hober, S.; Hjelmare, M.; Johansson, F.; Lee, S.; Lindskog, C.; Mulder, J.; Mulvey, C. M.; Nilsson, P.; Oksvold, P.; Rockberg, J.; Schutten, R.; Schwenk, J. M.; Sivertsson, Å.; Sjöstedt, E.; Skogs, M.; Stadler, C.; Sullivan, D. P.; Tegel, H.; Winsnes, C.; Zhang, C.; Zwahlen, M.; Mardinoglu, A.; Pontén, F.; von Feilitzen, K.; Lilley, K. S.; Uhlén, M.; Lundberg, E. A Subcellular Map of the Human Proteome. *Science* 2017, 356 (6340), eaal3321. <https://doi.org/10.1126/science.aal3321>.

(8) Brazdova, A.; Senechal, H.; Peltre, G.; Poncet, P. Immune Aspects of Female Infertility. *Int. J. Fertil. Steril.* 2016, 10 (1), 1–10. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4762>.

(9) Schjenken, J. E.; Robertson, S. A. The Female Response to Seminal Fluid. *Physiol. Rev.* 2020, 100 (3), 1077–1117. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2018>.

(10) Robertson, S. A.; Sharkey, D. J. Seminal Fluid and Fertility in Women. *Fertil. Steril.* 2016, 106 (3), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1101>.

(11) Schreiber, G. The Synthesis and Secretion of Plasma Proteins in the Liver. *Pathology (Phila.)* 1978, 10 (4), 394. [https://doi.org/10.1016/S0031-3025\(16\)39817-8](https://doi.org/10.1016/S0031-3025(16)39817-8).

(12) Adnane, M.; Meade, K. G.; O'Farrelly, C. Cervico-Vaginal Mucus (CVM) – an Accessible Source of Immunologically Informative Biomolecules. *Vet. Res. Commun.* 2018, 42 (4), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s11259-018-9734-0>.

(13) Pockley, A. G.; Barratt, C. L.; Bolton, A. E. Placental Protein 14 (PP14) Content and Immunosuppressive Activity of Human Cervical Mucus. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1989, 43, 317–323.

(14) He, B.; Xu, J.; Tian, Y.; Liao, B.; Lang, J.; Lin, H.; Mo, X.; Lu, Q.; Tian, G.; Bing, P. Gene Coexpression Network and Module Analysis across 52 Human Tissues. *BioMed Res. Int.* 2020, 2020, 6782046. <https://doi.org/10.1155/2020/6782046>.

(15) Kosmas, I. P.; Malvasi, A.; Vergara, D.; Mynbaev, O. A.; Sparic, R.; Tinelli, A. Adrenergic and Cholinergic Uterine Innervation and the Impact on Reproduction in Aged Women. *Curr. Pharm. Des.* 2020, 26 (3), 358–362. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200128092256>.

(16) Tommaso, S. D.; Cavallotti, C.; Malvasi, A.; Vergara, D.; Rizzello, A.; Nuccio, F. D.; Tinelli, A. A Qualitative and Quantitative Study of the Innervation of the Human Non Pregnant Uterus. *Curr. Protein Pept. Sci.* 18 (2), 140–148.

Implantace a diagnostika receptivity endometria

Implantation and diagnostics of endometrial receptivity

Dvořan M.¹, Vodička J.¹, Dostál J.¹, Hajdúch M.², Džubák P.², Pešková M.¹, Pilka R.¹

¹Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP, Olomouc, přednosta prof. MUDr. R. Pilka, Ph.D.

²Ústav molekulární a translační medicíny LF UP, Olomouc, přednosta doc. MUDr. M. Hajdúch, Ph.D.

ABSTRACT

Objective: Literature review of endometrial receptivity in embryo implantation and its diagnostic possibilities.

Design: Literature review.

Setting: Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc; Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc.

Results: Endometrial tissue is very dynamic, undergoing cyclic proliferation, differentiation and cell transportation, especially of immune system cells under the influence of circulating estradiol and progesterone. Endometrial remodelling during embryo implantation is

controlled by decidual cells senescence and effectivity of their immunologic destruction.

Endometrial receptivity can be assessed by transcriptomic profiling of endometrial biopsy using ERA system or proteomic analysis of either endometrial secretome or cervical mucus by gel electrophoresis (DIGE) or mass spectrometry (MS).

Conclusion: With respect to recent discoveries in endometrial physiology and molecular biology, clinical application of proteomic approaches in research of potential biomarkers of endometrial receptivity could be of interest.

KEYWORDS

Implantation, endometrial receptivity, proteomic analysis, secretome, cervical mucus

SOUHRN

Cíl studie: Přehled problematiky mechanismů receptivity endometria při implantaci embrya a možnosti její diagnostiky.

Typ studie: Přehledový článek.

Název a sídlo pacoviště: Porodnicko-gynekologická klinika, FN a LF UP Olomouc; Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP Olomouc.

Výsledky: Endometrium je velmi dynamická tkáň procházející cyklickou proliferací, diferenciací a transportem buněk, zvláště pak buněk imunitního systému. Vše se děje v závislosti na změně cirkulujících ovariálních hormonů estradiolu a progesteronu. Remodelování endometria v době implantace embrya je kontrolováno v časoprostoru intenzitou senescence deciduálních buněk a efektivitou jejich imunologické likvidace.

Receptivita endometria může být dnes hodnocena jak na bázi transkriptomického profilování biopsie endometria pomocí ERA systému, tak i proteomickou analýzou endometriálního sekretomu nebo cervikálního hlenu pomocí metod diferenční gelové elektroforézy (DIGE) a hmotnostní spektrometrie (MS).

Závěr: Vzhledem k nejnovějším poznatkům v oblasti fyziologie a molekulární biologie endometria by bylo zajímavé aplikovat proteomické přístupy v hledání kandidátních biomarkerů ze vzorků získaných pokud možno neinvazivními postupy a aplikovat je v klinické praxi.

KLÍČOVÁ SLOVA

Implantace, endometriální receptivita, proteomická analýza, sekretom, cervikální hlen

Mgr. Michal Dvořan, e-mail: michal.dvoran@fnol.cz

Čes. Gynek., 2018, 83, č. 4, s. 291-299

ÚVOD

Endometrium je dynamická tkáň procházející cyklickou regenerací a degenerací, která je založena nejen na změně cirkulujících ovariálních hormonů estradiolu a progesteronu, ale také na řadě

různých cytokinů, které regulují optimální vývoj endometriálních a imunitních buněk. Cyklické změny endometria jsou rozděleny na jednotlivé fáze: proliferační, sekreční, ischemickou a menstruační. Pokud nedojde k otěhotnění, dochází

k rozpadu tkáně následovanému její regenerací. Hlavním cílem tohoto komplexního procesu je úspěšná adheze, invaze a placentace plodu s další regenerací postpartum [11].

IMPLANTAČNÍ OKNO ENDOMETRIA

Koncept implantačního okna (window of implantation, WOI) definovaného jako krátké období v menstruačním cyklu, kdy se endometrium připravuje na nidaci embrya, byl poprvé navržen v roce 1956 [16]. Toto období trvá čtyři až pět dnů v období, kdy je možné detekovat maximální hladinu progesteronu v krvi. Na počátku devadesátých let minulého století byl koncept implantačního okna jako časového intervalu, ve kterém je nutné přenést embryo pro co nejvyšší šanci na implantaci, demonstrován Navotem a spol. [28]. V roce 1999 byla nazákladě detekce změny koncentrací estron 3-glucuronidu a pregnandiol 3-glucuronidu v moči stanovena ovulace následně nejvhodnější dobou pro implantaci embrya na 8–10 dní po ovulaci [42]. Důležitou receptivitu endometria ale nebyly zahrnuty individuální rozdíly nebo hormonální léčba předcházející embryotransferu (kontrolovaná ovulační stimulace, IVF v nativním cyklu, substituční hormonální terapie).

V dnešní době je možno díky novým diagnostickým metodám, jako je například transkripční profilování, přesněji klasifikovat období nejvyššího implantačního potenciálu a optimální receptivity endometria [34, 39]. Další, prozatím experimentální diagnostickou metodou je proteomická analýza endometriálního sekretu, popřípadě cervikálního hlenu, dnes většinou prováděná pomocí metod hmotnostní spektrometrie. Tyto metody dovolují velmi přesně detekovat různé proteiny přítomné v získaném vzorku. Role endometria není omezena jen na implantaci embrya, ale také na vytvoření adekvátního prostředí pro další rozvoj embrya. Postimplantační vývoj spojení s rozvojem komunikace mezi embryem a endometriem na základě signálních molekul a zajištění kontinuálního zdroje živin pro rostoucí embryo. Mezi buněčné interakce jsou přenášeny proteiny, cytokiny a jejich inhibitory, růstovými faktory, receptory nebo modulatory. Poslední studie však ukazují, že endometrium mnohem dynamičtěji kontroluje implantaci embrya, než se doposud myslelo.

AKTIVITA METALOPROTEINÁZ JAKO SOUČÁST PROCESU IMPLANTACE EMBRYA

Matrix-metaloproteinázy (MMP) jsou skupinou enzymatických proteinů s proteolytickou aktivitou, hrajících zásadní roli v procesu remodelace endometria (obr. 1). Syntéza MMP proteinů je regulována mnoha faktory včetně steroidních

hormonů, růstových faktorů, cytokinů, onkogénů [26]. Proteolytická aktivita MMP proteinů závisí na typu tkáně, lokálním pH a aktivitě jejich tkáňových inhibitorů (TIMP). Bylo zjištěno, že tyto inhibitory (TIMP 1–4) nejen regulují aktivitu metaloproteináz, ale také se účastní stimulace růstu tkání, angiogeneze a apoptotických procesů [43]. Důležitou součástí stability endometria je kontinuálně exprimovaný enzym MMP-2 ve stromálních buňkách endometria [20]. Exprese MMP-2 pozitivně koreluje s koncentrací estradiolu a negativně s hladinou progesteronu. Produkce MMP-2 dosahuje maxima v pozdní sekreční fázi cyklu a její pokles u koncových dnů dochází k rozpadu endometriální tkáně a počátku menstruace [20].

Další nepostradatelným enzymem je MMP-9, který se podílí na degradaci kolagenu IV a elastinu, jež jsou jedním z hlavních komponent extracelulární matrix (ECM). MMP-9 je exprimován ve stromálních buňkách endometria (hESC) jako neaktivní zymogen pro-MMP-9 [30]. Se zvýšením koncentrace jak estradiolu, tak i progesteronu klesá koncentrace pro-MMP-9, zatímco koncentrace MMP-9 zůstává stabilní a je závislá na poklesu koncentrace progesteronu [6]. TIMP-2 je protein syntetizovaný pouze fibroblasty a endoteliálními buňkami a má vysokou afinitu k MMP-2 a aktivovaně formě MMP-9. Naproti tomu glykoprotein TIMP-1 je produkován v cítych buňkách a má vysokou afinitu k pro-MMP-9. [27].

Nazákladě studie Cheginiho z roku 2003 bylo zjištěno, že jedním z hlavních cest aktivace pro-MMP-9 je pomocí relativně nedávno objevené metaloproteinázy MMP-26 [18]. MMP-26 je lokalizována pouze v epitelálních buňkách endometria (hEEC) s narůstající intenzitou exprese v průběhu proliferace v cyklu, maximálně v období ovulace a následně klesající tendencí v pozdní sekreční fázi cyklu. V menstruační fázi již nebyla MMP-26 exprese detekovatelná [33]. V prostředí in vitro kultivace byla prokázána regulace exprese MMP-26 prostřednictvím jak estradiolu, tak i progesteronu [33]. Maximální exprese MMP-26 v časně sekreční fázi cyklu je doprovázena expresí jejího inhibitoru TIMP-4. V hESC buňkách byla detekována mRNA, ale pouze ve velmi nízké úrovni samotného TIMP-4 inhibitoru. Samotný enzym TIMP-4 byl detekován v epitelálních buňkách hEEC, kde plní svou funkci regulace MMP-26 [32]. Tento fakt podporuje skutečnost, že endometriálním sekretem byl detekován pouze TIMP-4 bez MMP-26, který tak omezuje aktivitu MMP-26 v oblasti hEEC [32]. Nazákladě in vitro experimentů Ishikawa buňkami BeWo seroidy bylo později zjištěno, že MMP-26 se aktivně účastní implantace embrya (obr. 1) a její samotná exprese je regulována transkripčním faktorem homeobox a10 (HOXA-10) [23]. Exprese HOXA-10 spolu s dal-

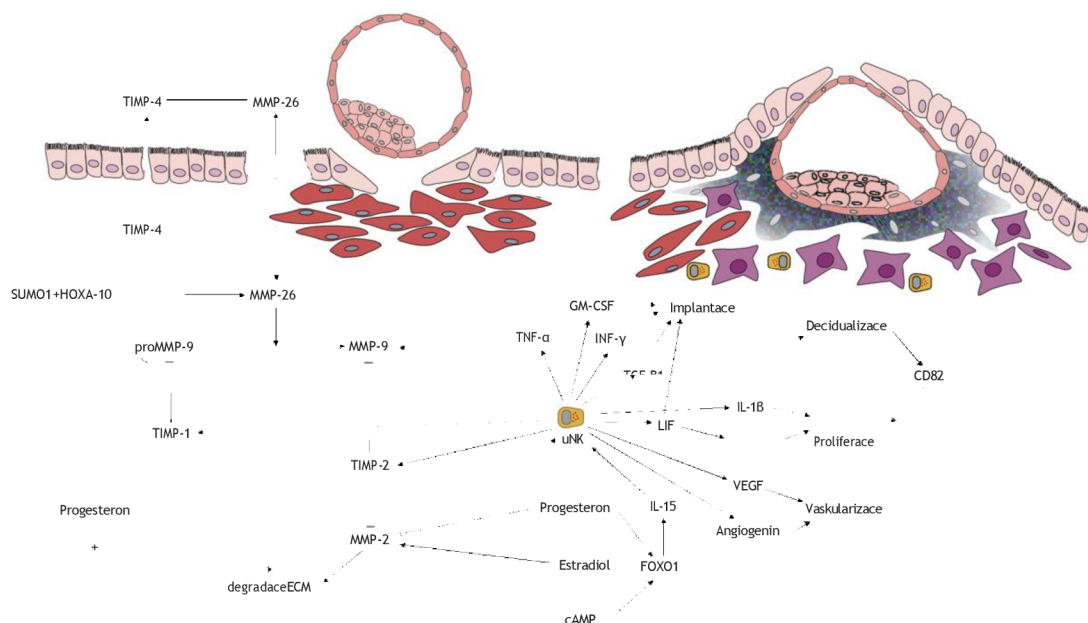
ším transkripčním faktorem HOXA-11 byla u 31 žen s endometriózou značně snížena a korelovala s objektivní změnou vráscitější struktury endometria, než to bylo v případě 26 kontrol [21]. V roce 2017 bylo dále zjištěno, že samotný transkripční faktor HOXA-10 je modifikován prostřednictvím small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1). Touto modifikací dochází ke snížení stability HOXA-10 a inhibici implantace embrya demonstrované in vitro na Ishikawa buňkách a BeWo sferoidech [22]. Vysoká úroveň modifikace HOXA-10 pomocí SUMO1 byla zjištěna u žen s opakovaným potratem (RIF) v průběhu sekreční fáze cyklu endometria vzhledem ke kontrolní skupině pacientek [22]. Na základě výše zmíněných skutečností může být dříve zmíněná skutečnost důležitou složkou v procesu implantace embrya na pozadí imunologického procesu decidualizace. MMP-26 je spolu s TIMP-4 vhodným kandidátem na potenciální biomarkery receptivity endometria.

PROCES DECIDUALIZACE ENDOMETRIA REGULUJE PRŮBĚH IMPLANTACE EMBRYA

Proces implantace je v mnohém podobný karcinogenezi. Dochází k destrukci endometriálních epiteliálních buněk implantujícím embryem, enzymatickým narušením matrix stromatua a ke konci invazi maternální deciduy a vnitřního myometria. Invaze semialogenního fetálního trofoblastu je tolerována a kontrolována deciduální reakcí [35].

Nekontrolovatelná invaze trofoblastu do endometria může způsobit v případě nadměrné invaze klinicky manifestovanou placentu accretanebo v případě neadekvátní invaze ohrožit plod a způsobit řadu těhotenských komplikací, jako je například intrauterinní růstová restrikce, preeklampsie nebo potrat v raném i pozdním stadiu gravidity [35]. Bylo zjištěno, že proces decidualizace začíná explozí volných radikálů pomocí aktivace signální dráhy NADPH oxidázy 4 (NOX-4) [37]. Signály dráhy NAD(P)H oxidázy 4 (NOX-4) jsou spouštěčem exprese dalších genů decidualizace s cílem zajistit optimální receptivitu endometria pro úspěšnou implantaci embrya. Samotný proces decidualizace je založen na základě prozánětlivé odpovědi kontrolované nejen progesteronem, ale také signální dráhou protein-kinázy A (PKA) a produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) [11].

Podstatou decidualizace je vytvoření lokálního edému, koncentrace a proliferace uterinních natural killer (uNK) buněk s následnou extenzivní remodelací hESC specializované deciduální buňky, které koordinují jak nidaci embrya, tak samotné vytváření placenty [11, 44]. Deciduální buňky a buňky trofoblastu embrya mezi sebou aktivně signalizují jednak na bázi chemotaxe prostřednictvím různých cytokinů, ale také pomocí exozomů, což jsou nano-vesikuly o průměru 40–150 nm. Ty obsahují různé signální molekuly jako solubilní, tak i membránově vázané [14]. Velmi důležitou úlohu v správné signalizaci



Obr. 1 Schéma regulace metaloproteináz (MMP) v závislosti na procesech decidualizace a implantace regulovaných uNK buňkami

s nidovaným embryem sehrávají uterinní natural killer buňky (uNK) (obr. 1), které se odlišují od periferních NK buněk na základě přítomnosti dvou povrchových antigenů CD56+aCD16+[40].

Tyto uNK buňky produkují velké množství různých signálních molekul (leukémie inhibující faktor – LIF, TNF- α , INF- γ , interleukin IL-1 β , GM-CSF, TGF- β 1, inhibitory metaloproteináz – TIMP-1, TIMP-2, VEGF aj.) důležitých pro správný vývoj nidovaného embrya a zaručují, že embryo bude obklopeno převahou kompetentních deciduálních buněk [4, 5, 40]. Tato selektivní likvidace senescentních deciduálních buněk umožní vznik již zmíněné imuno-privilegované deciduální matrix.

V těhotenství uNK buňky exprimují senescentní markery a jsou spíše proangiogenní než cytotoxické [36], což napomáhá vaskularizaci oblasti nidovaného embrya a následně také i přísunu živin pro další vývoj nidovaného embrya [36]. V průběhu decidualizace spouští akutní senescence subpopulace hESC buněk několik stupňový proces, jehož cílem je transformace cyklického endometria v gestační tkáň.

Deciduální buňky jsou tak schopny na základě vzájemné signalizace upravit migrační aktivitu vzhledem k implantujícímu embryu a jeho kvalitě. Tyto buňky alene dokážou rozlišit mezi normálníma abnormálníma embryem u pacientek s opakovaným potratem [41]. Tato implantační kompetence endometria je závislá od schopnosti IL-15 aktivovaných uNK buněk selektivně likvidovat senescentní deciduální buňky prostřednictvím exocytózy cytotoxických granulí v luteální fázi cyklu. Pokud v endometriu není přítomna žádná další patologie, tak by při zajištění funkčnosti tohoto mechanismu mělo být reprodukční potenciál endometria maximální [4]. Proliferace hESC buněk je zajištěna kombinací signálních molekul, mezi něž patří heparin-vázající EGF-like růstový faktor (HB-EGF), LIF a interleukin IL-1 β . Vedle proliferace je motilita hESC buněk zvýšena prostřednictvím CD82, který je známý metastatickým supresorem a značné míře je exprimován v deciduálních buňkách [12].

Komplexní remodelace endometria je kontrolována včas jak proliferací hESC buněk a intenzitou senescence deciduálních buněk, tak i efektivitou jejich imunologické likvidace [4]. V diferenciacích hESC buňkách je přítomen FOXO1, hlavní deciduální transkripční faktor zodpovědný za zá- stavu buněčného cyklu a indukci důležitých genů v procesu decidualizace, jako jsou prolaktin (PRL) a IGF-vázající protein 1 (IGFBP1). Exprese FOXO1 je regulována jak cAMP, tak i progesteronem [38]. FOXO1 byl také označen jako spouštěč senescence buněk u variálního karcinomu, který by byl ovlivno-

ván progesteronem [8]. Absencí FOXO1 v buňkách dochází také k omezení exprese IL-8, IL-6 a aktivity enzymu β -galaktosidázy asociovaného se senescencí (SABG). SABG je biomarker běžně používaný pro senescentní buňky, bohužel ale postrádá specifitu [25]. Právě při procesu decidualizace dochází paralelně ke stabilizaci p53 a zvýšení expresi p16, inhibitoru cyklin dependentní kinázy (CDK). Inhibice CDK vede k zastavení proliferace a buněčného cyklu [4]. Jako potenciální proteinové biomarkery receptivity endometria byly stanoveny lamin B1 (LMNB1), high mobility group box 2 (HMGB2), histone H2A variant macroH2A (mH2A), nucleosome linker histone H1 (H.1 and trimethylated lysine 9 on histone H3 (H3K9Me3)). Tato histonová varianta se vyskytuje ve formě heterochromatinu, která je přítomna v senescentních buňkách (SAHF) [4].

TRANSKRIPTOMICKÝ PODPIS RECEPTIVITY ENDOMETRIA

Jednou z možností, jak adekvátně definovat receptivitu endometria, je prostřednictvím charakterizace cyklických změn v endometriálním transkriptomu. Technologie DNA microarray je schopna simultánní analýzy transkriptomu u tisíců různých genů. Výsledky této transkriptomické analýzy dávají možnost charakterizace genové exprese a úrovním RNA vytvoření specifického profilu pro každý odebraný vzorek endometria [29]. Studie z roku 2004 Horcajada a spol. zkoumalavicenež 12000 genů pomocí DNA microarray technologie v období prereceptivním (LH peak+2 dny) a receptivním (LH peak+7 dnů) z bioptických vzorků lidského endometria [17]. Nalezeno bylo od 90 do 323 pozitivně regulovaných genů a 46–377 negativně regulovaných genů v receptivní fázi. Pouze u tří genů [osteopontin (strukturní protein), a lipoprotein D (transportér) a Dickkopf/DKK1 (signalizace)] byla data konzistentní mezi jednotlivými studiemi. Nicméně Diaz-Gimeno et al. [7] zavedli v roce 2011 diagnostický test ERA (endometrial receptivity array) zahrnující 238 kandidát- ních genů. Z nich 134 je transkripčně definováno. Cílem ERA testu je ztv. datování patologická klasifikace endometria. Limitací testu je nutnost odběru biopsie a s tím spojená invazivita výkonu společně s potenciální variabilitou genové exprese způsobené odběrem malého vzorku endometriální tkáň v určité lokální oblasti, která nemusí nutně poukazovat na celkovou stav receptivity endometria. S vývojem technologií se naskytla další alternativa diagnostiky receptivity endometria pomocí proteomických technik a analýz endometriálního sekretu munebo cervikálního hlenu.

Tab.1Proteinové markery receptivity endometria

Protein	Proteomická analýza	Analyzovaný vzorek	Reference
Collagen alpha1	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	Dominguez2009
Annexin A4	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	Dominguez2009, Chen2009
Vimentin	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	Dominguez2009
S100 calcium-binding protein A10	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	Dominguez2009, Bissonette 2016
Apolipoprotein A1	Hmotnostní spektrometrie	kultivační médium embrya, cervikální hlen	Nyalwidhe2013, Grande2015
Matrix metaloproteinase-26	Imunohistochemie, Western blot	endometriumbiopsie, Ishikawabuňky	Pilka2006, Jiang2014,
Homeobox a10	Western blot	Ishikawabuňky	Jana2013, Jiang2014,, Jiang 2017
Lipocalin-1	Hmotnostní spektrometrie	kultivační médium embrya	McReynolds2011
Heparin-binding EGF like growth factor	Hmotnostní spektrometrie	embryonální buňky	Katz-Jaffe2006 118
Cystatin like precursor	Hmotnostní spektrometrie	embryonální buňky	Katz-Jaffe2006
Caspase 1 precursor	Hmotnostní spektrometrie	embryonální buňky	Katz-Jaffe2006
Cytochrome oxidase subunit VIIIa	Hmotnostní spektrometrie	embryonální buňky	Katz-Jaffe2006
Ubiquitin	Hmotnostní spektrometrie	kultivační médium embrya	Katz-Jaffe2006+ Schoolcraft, 119
L-Glutamate NMDA receptor zeta subunit 1	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	DeSouza2005
Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas-1	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	DeSouza2005
Myosin light chain kinase 2	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	DeSouza2005
Isopentenyl diphosphate delta-isomerase	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	DeSouza2005
Macrophage migration inhibitor factor	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	DeSouza2005
Glycodelin	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Douglas2013, Grande2015
Stathmin 1	imunohistochemie, Western blot, Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	Dominguez2009
Annexin A2	Imunohistochemie, Western blot, Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	Dominguez2009
Monoamine oxidase A	Hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	Dominguez2009
Membrane-associated progesterone receptor component 1	Imunohistochemie, hmotnostní spektrometrie	endometriumbiopsie	Dominguez2009, Chen2009
Chlorine intracellular channel protein 1	Imunohistochemie	endometriumbiopsie	Chen2009,
RhoGDP-dissociation inhibitor 1	Imunohistochemie	endometriumbiopsie	Chen2009,
Ezrin	Imunohistochemie	endometriumbiopsie	Chen2009, Heng2011

Tab.1 Proteinové markery receptivity endometria (pokračování z předchozí strany)

Protein	Proteomická analýza	Analyzovaný vzorek	Reference
Calreticulum	Imunohistochemie	endometriumbiopsie	Parmar2009
α 1-antitrypsin	Imunohistochemie	endometriumbiopsie	Parmar2009
Matrixmetaloproteinase-9	Multipleximmunoassay	endometriální sekret	Hannan2010
Tissueinhibitorofmetaloproteinase-1	Multipleximmunoassay, Hmotnostní spektrometrie	endometriální sekret, cervikální hlen	Hannan2010, Grande2015
Lactotransferrin	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
WAPfouf-disulphidecoredomain protein2	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
Interferongamma	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
Spectralinphachain	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
Triosephosphateisomerase	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
E3ubiquitinproteinligaseSH3RF2	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
E3ubiquitinproteinligaseTopors	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
Dynein	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
KeratinsI, II	Hmotnostní spektrometrie	cervikální hlen	Grande2015
Mucin-1	Multipleximmunoassay	endometriální sekret	Hannan2010
VitaminDbindingprotein	Multipleximmunoassay	endometriální sekret	Hannan2010
Vascularendothelialgrowthfactor	Multipleximmunoassay	endometriální sekret	Hannan2011
Leukemiai inhibitoryfactor	Westernblot	endom.sekret/ stromální buňky endom.	vanderGaast2003, Cheng 2017
Activatingtranscriptionfactor3	Westernblot, Imunohistochemie	stromální buňky endometria	Cheng2017
Tumournecrosisfactor- α	Multipleximmunoassay	endometriální sekret	Hannan2010
Interleukin-1 β	Multipleximmunoassay	endometriální sekret	Hannan2010
Dickkopfhomologue1	Multipleximmunoassay	endometriální sekret	Hannan2010
Monocytechemoatraktantprotein-1	Multipleximmunoassay	endometriální sekret	Hannan2010
Tissueinhibitorofmetaloproteinase-4	Westernblot	endometriální sekret	Pilka2006
Tumoursuppressorproteinp53	Westernblot	endometriumbiopsie	Brigton2017
Tumoursuppressorproteinp16	Westernblot	endometriumbiopsie	Brigton2017
LaminB1	Westernblot	endometriumbiopsie	Brigton2017
Highmobilitygroupbox2	Westernblot	endometriumbiopsie	Brigton2017
HistoneH2AvariantmacroH2A	Westernblot	endometriumbiopsie	Brigton2017
Trimethylatedlysine9onhistoneH3	Westernblot	endometriumbiopsie	Brigton2017
NucleosomelinkerhistoneH1	Westernblot	endometriumbiopsie	Brigton2017

WB-Westernblot, IHC-Imunohistochemie, MS-hmotnostní spektrometrie

PROTEOMICKÉ PŘÍSTUPY V DIAGNOSTICE RECEPTIVITY ENDOMETRIA

Složení proteomu endometria je velmi komplexní a jeho analýza může být ovlivněna jak pre-analytickou fází odběru vzorku, tak i post-translačními modifikacemi analyzovaných proteinů [2]. Hlavní komponenty endometriálního sekretu jsou cytokiny, močovina, glukóza, aminokyseliny, metaloproteinázy a jejich inhibitory, imunoglobuliny, muciny, α -1 antitrypsin prekurzor, haptoglobin, transferrin a další proteiny [1,31]. Některé z proteinů mohou sloužit jako biomarkery pro stanovení receptivity endometria (tab. 1). Komplexní profil proteomických biomarkerů nabízí techniky diferenční gelové elektroforézy (DIGE), multiplex immunoassay či hmotnostní spektrometrie (MS) z různých typů vzorků.

Vzorek pro proteomickou analýzu může být získán buď přímo z endometria biopsií [9], laváží, nebo odběrem endometriálního sekretu [3]. Laváž je možná získat až desetkrát více proteinů než aspirací díky uvolnění dalších proteinů z glykokalyxu endometria. Alternativní metodou je získání vzorku z cervikálního hlenu [13] nebo cervikální zátky [24]. Výhodou odběru cervikálního hlenu je neinvazivní přístup. Podle Boomsma 2010 nebyl odběr endometriálního sekretu katétrelem pro embryotransfer doprovázen snížením implantation rate [3]. Spříchodem vysoce výkonné high-throughput tandemové hmotnostní spektrometrie (MS) začalo být možné kvantifikovat z jednoho vzorku jeho komplexní proteomické složení. V roce 2009 Dominguez et al. porovnali vzorky receptivního a nereceptivního endometria pomocí DIGE. Kandidátní skupiny proteinů byly poté z gelu vyjmuty a analyzovány pomocí MALDI-MS. Výsledky studie označily stathmin-1 a annexin A2 jako rozdílně regulované proteiny a potenciální proteomické biomarkery [9].

Počátky proteomických studií endometria se datují do šedesátých let minulého století, kdy se jako hlavní metoda používala imunodifúze reakce se specifickými protilátkami proti hledanému proteinu [10]. Výsledky první komplexní proteomické studie naznačily, že glykodelin a rozdílné množství inhibujících faktorů (LIF) koreluje s histologickým nálezem maturace endometria. Zatím jedna z největších studií zahrnovala vzorky endometriálního sekretu odebraného před embryotransferem u 210 IVF pacientek. Výsledky proteomické analýzy pomocí multiplex immunoassay odhalily dalších 17 potenciálních regulátorů implantace, interleukiny 1- β , 5, 6, 10, 12, 15, 17 a 18, TNF- α , INF- γ , eotaxin, VEGF, Dickkopf homolog 1, heparin-vázající epidermální růstový faktor (HB-EGF), INF- γ indukující 10 kD protein (IP-10), monocytní chemoatraktant protein (MCP-1), macrophage migration inhibitory

factor. Hlavními markery byly stanoveny IL-1 β a TNF- α [15]. Pomocí DIGE Chen et al., definovali 196 proteinů, které jsou odlišně produkovány endometriem v proliferacioní a sekreční fázi. Bohužel většina proteinů nebyla shodně daty získanými nazákladě genetických analýz. Pouze šest proteinů se shodovalo s proteomickými daty [19]. Za příčinu neshody byla označena lokální variace exprese vyšetřovaných genů, protože biopsie reprezentuje pouze 2–4% povrchu epitelu. Rozdíly mohly být dále způsobeny heterogenitou odebrané endometriální tkáně (epiteliální, stromální buňky, žlázy, komponenty vaskularizace apod.), která ve výsledku exprimuje různé proteomické profily [19]. Naproti tomu odběra analýza endometriálního sekretu nebo cervikálního hlenu je méně invazivní alternativou než biopsie a je schopna poskytnout komplexní obraz receptivity endometria díky technikám, jako je hmotnostní spektrometrie.

ZÁVĚR

Receptivita endometria může dnes být hodnocena jak konvenční analýzou transkriptomu pomocí ERA systému, tak i proteomickou analýzou endometriálního sekretu nebo cervikálního hlenu prostřednictvím hmotnostní spektrometrie. Vzhledem ke nejnovějším poznatkům v oblasti fyziologie endometria by bylo vhodné se zaměřit na bližší výzkum biomarkerů účastnících se regulace imunitní odpovědi na úrovni deciduy, signalizace uNK buněk a komunikace mezi buňkami trofoblastu embrya a stromálními buňkami endometria. Kandidátní biomarkery by mohly sloužit jako podklad pro klinickou aplikaci nové alternativní diagnostické metody receptivity endometria.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV-08-00291.

Veškerá práva podle předpisů o ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

ZKRATKY

ATR3 – activating transcription factor 3 CD82 – cluster of differentiation 82

CDK – cyklin dependentní kinázy DIGE – diferenční gelové elektroforéza ECM – extracelulární matrix

ERA – endometrial receptivity array

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor

H. H1 – nucleosome linker histone H1

H3K9me3 – trimethylated lysine 9 on histone H3 HB-EGF – heparin-vázající EGF-likérůstový faktor hCG – lidský chorionový gonadotropin

hEEC – lidské epiteliální buňky endometria hESC
 – lidské stromální buňky endometria HMGB2 –
 high mobility group box 2

HOXA-10–homeoboxa10

IGFBP1–IGF-vázající protein 1 (gen) IL –
 interleukin (obecně)

INF- γ – interferon gamma

IP10–INF- γ indukující 10 kd protein IVF – in
 vitro fertilizace

LIF – leukémie inhibující faktor LMNB1 –
 lamin B1

MALDI (MS) – matrix-assisted laser desorption/ioniza-
 tion MS

MCP-1 – monocytní chemoatraktant protein
 mH2A – histone H2A variant macroH2A MMP –
 matrix metaloproteináza (obecně) MS – mass
 spectrometry

NOX-4–NAD(P)H oxidáza 4

p16 – tumour suppressor protein p16 (cyclin-dependent
 kinase inhibitor 2A)

p53–tumour suppressor protein p53 (transformation-
 related protein 53)

PG – prostaglandiny PRL –
 prolaktin (gen)

RIF – repeated implantation failure (opakované potrá-
 cení)

S100A10–S100 calcium-binding protein A10 (p11) SAbG –
 senescence-associated β -galactosidase

SAHF–senescence-associated heterochromatin forma-
 tion

SUMO1–small ubiquitin-like modifier 1 TIMP –
 tkáňový inhibitor MMP

TNF- α –tumour necrosis factor alpha uNK –
 uterine natural killer

VEGF–vascular endothelial growth factor

WOI–window of implantation (implantační okno)

LITERATURA

1. **Beier, HM., Beier-Hellwig, K.** Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*, 1998, 4(5), p. 448–458.
2. **Berlanga, O., Bradshaw, HB., Vilella-Mitjana, F., et al.** How endometrial secretomics can help in predicting implantation. *Placenta*, 2011, 32 Suppl. 3, p. S271–S275.
3. **Boomsma, CM., Kavelaars, A., Eijkemans, MJ., et al.** Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod*, 2009, 24(6), p. 1427–135.
4. **Brighton, PJ., Maruyama, Y., Fishwick, K., et al.** Clearance of senescent decidual cells by uterine natural killer cells in cycling human endometrium. *Elife*, 2017, 6.
5. **Cooper, MA., Fehniger, TA., Caligiuri, MA.** The biology of human natural killer cell subsets. *Trends Immunol*, 2001, 22(11), p. 633–640.
6. **Cornet, PB., Galant, C., Eeckhout, Y., et al.** Regulation of matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A in endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(2), p. 1001–111.
7. **Diaz-Gimeno, P., Horcajadas, JA., Martinez-Conejero, JA., et al.** A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril*, 2011, 95(1), p. 50–60, 60e1–15.
8. **Diep, CH., Charles, NJ., Gilks, CB., et al.** Progesterone receptors induce FOXO1-dependent senescence in ovarian cancer cells. *Cell Cycle*, 2013, 12(9), p. 1433–1449.
9. **Dominguez, F., Garrido-Gomez, T., Lopez, JA., et al.** Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated. *Hum Reprod*, 2009, 24(10), p. 2607–2617.
10. **Elstein, M., Pollard, AC.** Proteins of cervical mucus. *Nature*, 1968, 219(5154), p. 612–613.
11. **Gellersen, B., Brosens, JJ.** Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*, 2014, 35(6), p. 851–905.
12. **Gellersen, B., Wolf, A., Kruse, M., et al.** Human endometrial stromal cell-trophoblast interactions: mutual stimulation of chemotactic migration and promigratory roles of cell surface molecules CD82 and CEACAM1. *Biol Reprod*, 2013, 88(3), p. 80.
13. **Grande, G., Milardi, D., Vincenzoni, F., et al.** Proteomic characterization of the qualitative and quantitative differences in cervical mucus composition during the menstrual cycle. *Mol Biosyst*, 2015, 11(6), p. 1717–1725.
14. **Greening, DW., Nguyen, HP., Elgass, K., et al.** Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions. *Biol Reprod*, 2016, 94(2), p. 38.
15. **Hannan, NJ., Stephens, AN., Rainczuk, A., et al.** 2D-DiGE analysis of the human endometrial secretome reveals differences between receptive and nonreceptive states in fertile and infertile women. *J Proteome Res*, 2010, 9(12), p. 6256–6264.
16. **Hertig, AT., Rock, J., Adams, EC.** A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat*, 1956, 98(3), p. 435–493.
17. **Horcajadas, JA., Riesewijk, A., Dominguez, F., et al.** Determinants of endometrial receptivity. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1034, p. 166–175.
18. **Chegini, N., Rhoton-Vlasak, A., Williams, RS.** Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 and -4 in endometrium throughout the normal menstrual cycle and alteration in users of levonorgestrel implants who experience irregular uterine bleeding. *Fertil Steril*, 2003, 80(3), p. 564–570.
19. **Chen, JI., Hannan, NJ., Mak, Y., et al.** Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium. *J Proteome Res*, 2009, 8(4), p. 2032–2044.
20. **Chung, HW., Lee, JY., Moon, HS., et al.** Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. *Fertil Steril*, 2002, 78(4), p. 787–795.
21. **Jana, SK., Banerjee, P., Mukherjee, R., et al.** HOXA-11 mediated dysregulation of matrix remodeling during implantation win-

- dow in women with endometriosis. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30(11), p.1505–1512.
22. **Jiang, R., Ding, L., Zhou, J., et al.** Enhanced HOXA10 sumoylation inhibits embryo implantation in women with recurrent implantation failure. *Cell Death Discov*, 2017, 3, p. 17057.
 23. **Jiang, Y., Yan, G., Zhang, H., et al.** Activation of matrix metalloproteinase-26 by HOXA10 promotes embryo adhesion in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(3), p.622–628.
 24. **Lee, DC., Hassan, SS., Romero, R., et al.** Protein profiling underscores immunological functions of uterine cervical mucus plug in human pregnancy. *J Proteomics*, 2011, 74(6), p.817–828.
 25. **Matjusaitis, M., Chin, G., Sarnoski, EA., et al.** Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res Rev*, 2016, 29, p.1–12.
 26. **Murphy, G., Nagase, H.** Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, 2008, 29(5), p.290–308.
 27. **Nagase, H., Visse, R., Murphy, G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(3), p. 562–573.
 28. **Navot, D., Scott, RT., Drosch, K., et al.** The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril*, 1991, 55(1), p.114–118.
 29. **Nevins, JR., Potti, A.** Mining gene expression profiles: expression signatures as cancer phenotypes. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(8), p. 601–609.
 30. **O'Sullivan, S., Medina, C., Ledwidge, M., et al.** Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: biological and pharmacological significance—NO and MMP-9 interactions. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(3), p. 603–617.
 31. **Parmar, T., Gadkar-Sable, S., Savardekar, L., et al.** Protein profiling of human endometrial tissues in the midsecretory and proliferative phases of the menstrual cycle. *Fertil Steril*, 2009, 92(3), p.1091–1103.
 32. **Pilka, R., Noskova, V., Domanski, H., et al.** Endometrial TIMP-4 mRNA is expressed in the stroma, while TIMP-4 protein accumulates in the epithelium and is released to the uterine fluid. *Mol Hum Reprod*, 2006, 12(8), p.497–503.
 33. **Pilka, R., Whatling, C., Domanski, H., et al.** Epithelial expression of matrix metalloproteinase-26 is elevated at mid-cycle in the human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2003, 9(5), p.271–277.
 34. **Ponnampalam, AP., Weston, GC., Trajstman, AC., et al.** Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(12), p.879–893.
 35. **Quenby, S., Brosens, JJ.** Human implantation: a tale of mutual maternal and fetal attraction. *Biol Reprod*, 2013, 88(3), p. 81.
 36. **Rajagopalan, S., Long, EO.** Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(50), p.20596–20601.
 37. **Salker, MS., Nautiyal, J., Steel, JH., et al.** Disordered IL-33/ST2 activation in decidualizing stromal cells prolongs uterine receptivity in women with recurrent pregnancy loss. *PLoS One*, 2012, 7(12), p.e52252.
 38. **Takano, M., Lu, Z., Goto, T., et al.** Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(10), p.2334–2349.
 39. **Talbi, S., Hamilton, AE., Vo, KC., et al.** Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*, 2006, 147(3), p.1097–1121.
 40. **Ulcova-Galova, Z., Pesek, M., Chaloupka, P., et al.** [Screening of endometrial NK cells in selected infertile patients. First part—Methods and current results]. *Ces Gynecol* 2017, 82(5), p.366–371.
 41. **Weimar, CH., Kavelaars, A., Brosens, JJ., et al.** Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high- and low-quality human embryos. *PLoS One*, 2012, 7(7), p.e41424.
 42. **Wilcox, AJ., Baird, DD., Weinberg, CR.** Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med*, 1999, 340(23), p.1796–1799.
 43. **Wilkins-Port, CE., Higgins, SP., Higgins, CE., et al.** Complex regulation of the pericellular proteolytic microenvironment during tumor progression and wound repair: functional interactions between the serine protease and matrix metalloproteinase cascades. *Biochem Res Int*, 2012, 2012, p. 454368.
 44. **Zhang, J., Dunk, CE., Lye, SJ.** Sphingosine signalling regulates decidual NK cell angiogenic phenotype and trophoblast migration. *Hum Reprod*, 2013, 28(11), p.3026–3037.

Mgr. Michal Dvořan

Porodnicko-gynekologická klinika
FN LFUP
I. P. Pavlova 6
77900 Olomouc
e-mail: michal.dvoran@fnol.cz

