

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Helena Klementová

Diagnostický potenciál extracelulárních vesikulů

Diagnostic potential of extracellular vesicles

Diplomová práce

Školitel: doc. Ing. Karel Holada, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Helena Klementová

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. Ing. Karlu Holadovi, Ph.D. za odborné rady a věnovaný čas při vedení této diplomové práce. Rovněž děkuji Mgr. Jakubu Soukupovi za získání výstupních dat z elektronové mikroskopie, poskytnutí cenných rad při provánění experimentů i sepisování této práce a Mgr. Marii Kostelanské, Ph.D. za cenné rady a poskytnutou pomoc při zvládnání metodiky i při samotném provádění experimentů a jejich vyhodnocení. Rovněž bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Evě Kubala Havrdové, CSc., Ing. Miluši Pavelcové a pracovníkům Neurologické kliniky VFN za poskytnutí vzorků pro studii MS a prof. MUDr. Zbyňku Straňákovi, CSc., MBA, MUDr. Janu Šircovi, MUDr. Tereze Brožové a Biochemické laboratoři ÚPMD za poskytnutí vzorků pro studii předčasně narozených novorozenců. Za poskytnutou buněčnou linii HUVEC děkuji Mgr. Johance Kučerové, BIOCEV a za kontrolní vzorky plné krve odběrovému centru ÚHKT. Dále děkuji kolegyním Mgr. Nicol Bernardové, Mgr. Soně Galuškové a kolektivu Prionové laboratoře z ÚIM, 1.LF UK za podporu při vypracování této práce. Velice děkuji také celé své rodině, a to především svým rodičům a manželovi, za podporu po celou dobu studia.

Práce byla podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK 1322119), projektem Cooperatio 207032-3 a MŠMT (SVV 260 520).

Abstrakt

Extracelulární vesikuly (EV) jsou membránové váčky produkované buňkami. Řada publikovaných prací popisuje změny počtu EV v tělních tekutinách za různých patologických stavů. V naší práci jsme pomocí průtokové cytometrie analyzovali počty EV v periferní krvi pacientů s roztroušenou sklerózou (MS) a v pupečnickové krvi u nedonošených novorozenců se zánětem. Metodu detekce jsme extenzivně optimalizovali a přítomnost EV ve vzorcích ověřili pomocí elektronové mikroskopie. U pacientů s nově diagnostikovanou MS jsme našli snížený počet T-lymfocytárních a fosfatidylserin pozitivních EV ve srovnání se zdravými dárci krve. U MS pacientů vyžadujících změnu léčby byl nižší počet B-lymfocytárních EV ve srovnání s neurologickými kontrolami. Podobně byl nižší počet endotelových EV u MS pacientů podstupujících biologickou léčbu Natalizumabem. V pupečnickové krvi nedonošených novorozenců se zánětem jsme pozorovali signifikantně zvýšené počty placentárních, endoteliálních a destičkových EV oproti nedonošeným novorozencům bez zánětu. Ve srovnání s donošenými kontrolami nebyly změny v počtech EV signifikantní. Počet endoteliálních EV v pupečnickové krvi koreloval s koncentrací IL-6 v žilní krvi novorozenců. Podobně koreloval i počet destičkových a fosfatidylserin pozitivních EV s koncentrací volného hemoglobinu v analyzovaných vzorcích. Výsledky práce ukázaly signifikantní rozdíly v počtech EV u studovaných skupin pacientů s MS a u nedonošených novorozenců. Potvrdili jsme vhodnost průtokové cytometrie pro analýzu počtu EV u definovaných skupin pacientů. Velké individuální rozdíly v počtech EV a výrazný překryv dat mezi pacienty a kontrolami jsou však překážkou pro diagnostické využití analýzy počtu EV v krvi pomocí průtokové cytometrie v klinické praxi.

Klíčová slova: Extracelulární vesikuly, průtoková cytometrie, předčasné porody, roztroušená skleróza, diagnostika

Abstract

Extracellular vesicles (EV) are membrane particles produced by cells. Many published papers describe changes in the level of EV in body fluids under various pathological conditions. In our study, we analyzed the numbers of EV in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis (MS) and in the umbilical cord blood of preterm newborns with inflammation using flow cytometry. We extensively optimized the detection method and verified the presence of EV in the samples using electron microscopy. We found a reduced number of T-cell and phosphatidylserine-positive EV in patients with newly diagnosed MS compared to healthy blood donors. In MS patients requiring a change in the treatment, the number of B-cell EV was lower compared to neurological controls. Similarly, the level of endothelial EV was lower in MS patients receiving Natalizumab treatment. In the umbilical cord blood of preterm newborns with inflammation, we observed significantly increased numbers of placental, endothelial and platelet EV compared to preterm newborns without inflammation. Compared to the full-term controls, the changes in EV numbers were not significant. The number of endothelial EV in umbilical cord blood correlated with the concentration of IL-6 in the venous blood of newborns. Likewise, the number of platelet and phosphatidylserine positive EV correlated with the concentration of free hemoglobin in the analyzed samples. The results showed significant differences in the number of EV in the studied groups of patients with MS and in the premature newborns. We thus confirmed the suitability of flow cytometry for the analysis of the number of EV in defined groups of patients. However, large individual differences in EV counts and significant data overlap between patients and controls are an obstacle to the diagnostic use of blood EV analysis using flow cytometry in clinical practice.

Key words: Extracellular vesicles, flow cytometry, preterm birth, multiple sclerosis, diagnosis

Obsah

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
Seznam použitých zkratk 6	6
1 Úvod.....	10
2 Literární přehled.....	11
2.1 Extracelulární vesikuly	11
2.1.1 Základní rozdělení a biogeneze.....	11
2.1.2 Funkce EV.....	13
2.2 Metody práce s EV.....	15
2.2.1 Izolace EV.....	15
2.2.2 Analýza EV	16
2.2.3 Pozorované rozdíly počtu EV při onemocnění	17
2.3 Roztroušená skleróza	19
2.3.1 Současná diagnostika MS	20
2.3.2 Léčba MS	21
2.3.3 EV v neurologii.....	22
2.4 Předčasné porody	24
2.4.1 Klasifikace porodu dle gestačního věku	24
2.4.2 Důvody předčasných porodů a chorioamnionitida	24
2.4.3 Komplikace předčasně narozených novorozenců	25
2.4.4 EV spojené s porody a reprodukci	26
2.5 Cytometrie EV	28
2.5.1 Průtoková cytometrie	28
2.5.2 Odlišnost cytometrické analýzy EV od analýzy buněk.....	29
2.5.3 Řešení problémů při analýze EV.....	30
3 Cíle práce.....	32
4 Materiál a metody.....	33

4.1	Použitý materiál	33
4.1.1	Protilátky	33
4.1.2	Chemikálie	35
4.1.3	Roztoky a další reagentie.....	35
4.1.4	Další materiál	37
4.2	Použité přístroje	37
4.3	Metody	38
4.3.1	Titrace protilátek	38
4.3.2	Sběr vzorků	41
4.3.3	Rozdělení patientských vzorků.....	41
4.3.4	Průtoková cytometrie	42
4.3.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace hemoglobinu ve vzorcích plasmy z pupečnickové krve	54
4.3.6	Western blot	54
4.3.7	Elektronová mikroskopie	56
4.3.8	Statistická analýza	57
5	Výsledky.....	58
5.1	Analýza EV u pacientů s MS	58
5.1.1	Charakteristika skupin.....	58
5.1.2	Průtoková cytometrie	58
5.1.3	Elektronová mikroskopie	63
5.2	Analýza EV u předčasně narozených novorozenců.....	64
5.2.1	Charakteristika skupin.....	64
5.2.2	Spektrofotometrie hemolytických vzorků.....	65
5.2.3	Průtoková cytometrie	65
5.2.4	Elektronová mikroskopie	76
5.2.5	Western blot	77

6	Diskuse	79
7	Závěr.....	85
8	Použitá literatura.....	86

Seznam použitých zkratk

AF – Alexa Fluor (*Alexa Fluor*)

APC – Allofykocyanin (*Allophycocyanin*)

APS – Peroxodisíran amonný (*Ammonium persulfate*)

BSA – Albumin z hovězího séra (*Bovine Serum Albumin*)

BV – Brilliant Violet (*Brilliant Violet*)

C – kontrolní skupina donošených novorozenců (*control group of full-term newborns*)

CD – diferenciační antigen (*cluster of differentiation*)

CF – na cyaninu založené flurofory (*cyanine-based fluorescent dyes*)

CI – interval spolehlivosti (*confidence interval*)

CNS – centrální nervová soustava (*central nervous system*)

COVID-19 – koronavirové onemocnění 2019 (*coronavirus disease 2019*)

CRP – C reaktivní protein (*C-reactive protein*)

CS – císařský řez (*ceasarean section*)

CSF – cerebrospinální tekutina (*cerebrospinal fluid*)

Cy – cyanin (*cyanine*)

DCC – opožděné svorkování pupeční šňůry (*delayed cord clamping*)

DK – skupina zdravých dárců krve

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)

EAE – experimentální autoimunitní encefalomyelitida (*experimental autoimmune encephalomyelitis*)

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

EpCAM – epiteliální buněčné adhezivní molekuly (*epithelial cell adhesion molecule*)

ERF – ekvivalentní referenční jednotka fluoroforů (*equivalent reference fluorophores unit*)

ESCRT – endosomální třídící komplex potřebný pro transport (*endosomal sorting complex required for transport*)

EV – extracelulární vesikuly (*extracellular vesicles*)

FasL – Fas ligand (*Fas ligand*)

FITC – fluorescein isothiokyanát (*fluorescein isothiocyanate*)

FIRS – syndrom zánětlivé odpovědi plodu (*fetal inflammatory response syndrome*)

FSC – dopředný rozptyl (*forward scatter*)

HSP70 – 70kDa protein tepelného šoku (*70 kDa Heat Shock Protein*)

HUVEC – lidské endoteliální buňky pupečnickové žíly (*Human umbilical vein endothelial cells*)

IFN – interferon (*interferon*)

Ig – imunoglobulin (*immunoglobulin*)

IL – interleukin (*interleukin*)

ILV – intraluminální vesikuly (*intraluminal vesicles*)

IR – infračervená (*infrared*)

ISEV – Mezinárodní společnost pro extracelulární vesikuly (*The International Society for Extracellular Vesicles*)

MFI – medián intenzity fluorescence (*median fluorescence intensity*)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (*major histocompatibility complex*)

miRNA – mikro RNA (*micro RNA*)

mRNA – mediátorová RNA (*messenger RNA*)

MS – roztroušená skleróza (*Multiple sclerosis*)

MVB – multivesikulární tělísko (*multivesicular body*)

N – pacienti s roztroušenou sklerózou léčení Natalizumabem

ND – nově diagnostikovaní pacienti s roztroušenou sklerózou

NK – přirozený zabíječ (*natural killer*)

NP – pacienti s neurologickými potížemi, ale vyloučenou roztroušenou sklerózou

ns – nesignifikantní (*not significant*)

NTA – analýza sledování nanočástic (*nanoparticle tracking analysis*)

PBS – Fosfátový pufr (*Phosphate-buffered saline*)

PCT – prokalcitonin (*procalcitonin*)

P-Ec – preeklampsie (*preeclampsia*)

PE – fykoerytrin (*phycoerythrin*)

PFA – Paraformaldehyd (*paraformaldehyde*)

PT – předčasně narození novorozenci bez zánětu (*preterm newborns without inflammation*)

PTIN – předčasně narození novorozenci se zánětem (*preterm newborns with inflammation*)

PVDF – Polyvinyliden difluorid (*Polyvinylidene difluoride*)

RI – refrakční index (*refractive index*)

RNA – ribonukleová kyselina (*ribonucleic acid*)

S1P – sfingosin-1 fosfát (*sphingosine 1-phosphate*)

SARS-CoV-2 – koronavirus související s těžkým akutním respiračním syndromem 2 (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*)

SB – vzorkový pufr (*sample buffer*)

SDS – Dodecylsírán sodný (*sodium dodecyl sulfate*)

SSC – boční rozptyl (*side scatter*)

TEM – Transmisní elektronová mikroskopie (*Transmission electron microscopy*)

TEMED – Tetramethylendiamin (*Tetramethylenediamine*)

TNF – faktor nekrotizující nádory (*tumor necrosis factor*)

tt – týden těhotenství

TX100 – Triton X-100 (*Triton X-100*)

UCM – dojení pupeční šňůry (*umbilical cord milking*)

VFN – všeobecná fakultní nemocnice

VSSC – boční rozptyl na fialovém laseru (*violet side scatter*)

ZL – skupina pacientů s roztroušenou sklerózou se změnou léčby

1 Úvod

Extracelulární vesikuly (EV, *Extracellular Vesicles*) jsou malé membránové částice odvozené z buněk. Vyskytují se ve všech tělních tekutinách. Slouží k mezibuněčné komunikaci a přispívají k fyziologickým i patologickým stavům organismů, a to přenosem jejich nákladu, ale i interakcí povrchových molekul.

V kohortových studiích u pacientů s různými komplikacemi byl pozorován rozdíl v počtech nebo složení EV oproti zdravým kontrolám. Odlišné hladiny EV, jejich složení nebo náklad tak mohou být diagnostickým nebo prognostickým ukazatelem pro klinickou praxi.

Roztroušená skleróza (MS, *Multiple sclerosis*) je demyelinizační autoimunitní onemocnění centrální nervové soustavy (CNS, *central nervous system*). Diagnostika je zaměřena primárně na anamnézu pacienta, zobrazovací techniky jako je magnetická rezonance a případné vyšetření cerebrospinální tekutiny (CSF, *cerebrospinal fluid*). Z důvodu snížení chybovosti, zjednodušení a urychlení diagnostiky je stálá snaha nalezení vhodného biomarkeru MS.

K předčasným porodům dochází ve vyspělých zemích v 7,5-12 % případů ze všech porodů. Předčasný porod je nejčastějším důvodem neonatální úmrtnosti. Jedním z důvodů předčasných porodů jsou záněty plodových obalů, které způsobením zánětlivého stavu novorozence zhoršují komplikovaný stav nedovyvinutého jedince. Včasné podání vhodné léčby zvyšuje pravděpodobnost přežití novorozenců, a proto je včasná a správná diagnostika systémového zánětu novorozenců nezbytná.

V naší práci sledujeme diagnostický potenciál EV v periferní krvi u pacientů s MS a v pupečnickové krvi u předčasně narozených novorozenců.

2 Literární přehled

2.1 Extracelulární vesikuly

EV jsou částice o velikosti desítek až stovek nm vylučované buňkami, obalené dvouvrstevnou fosfolipidovou membránou, které neobsahují funkční jádro a nemohou se replikovat (Théry *et al.*, 2018). Vyskytují se ve všech tělních tekutinách, jako krev, moč, mozkomíšni mok, mateřské mléko, pleurální výpotek apod. (Szatanek *et al.*, 2017) a jsou produkovány všemi dosud studovanými buněčnými typy (Kuiper *et al.*, 2020, Gandham *et al.*, 2020). Mohou obsahovat genetickou informaci ve formě deoxyribonukleové kyseliny (DNA; *deoxyribonucleic acid*), ribonukleové kyseliny (RNA, *ribonucleic acid*) v různých formách, jako mediátorová RNA (mRNA, *messenger RNA*) nebo mikro RNA (miRNA; *micro RNA*), dále pak různé proteiny, lipidy, metabolity a další složky buněčného obsahu (Gandham *et al.*, 2020).

Vzhledem ke vzrůstající popularitě studia EV navrhla v roce 2014 Mezinárodní společnost pro extracelulární vesikuly (ISEV, *The International Society for Extracellular Vesicles*) základní doporučení pro studium, analýzu a správnou charakterizaci EV (Lötvall *et al.*, 2014). ISEV tyto pokyny upravuje podle nově získaných informací a aktualizovaných požadavků. V současné době se pro charakterizaci EV vychází z přepracovaných návrhů ISEV z roku 2018 (Théry *et al.*, 2018).

2.1.1 Základní rozdělení a biogeneze

EV se do extracelulárního prostoru uvolňují při aktivaci buněk, buněčném stresu, apoptóze (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014) i při fyziologickém stavu buňky (van Niel *et al.*, 2018). Sekreci napomáhá zvýšená koncentrace Ca^{2+} (Milane *et al.*, 2015). Buňky, ze kterých jsou EV odvozeny, se označují jako mateřské buňky (Gandham *et al.*, 2020). Rozdělení EV probíhá buďto na základě jejich velikosti, biogeneze nebo buněčného původu. Nejčastější rozdělení je podle biogeneze, a to na exosomy, mikrovesikuly a apoptotická tělíška (Mulcahy *et al.*, 2014). Neexistují však obecné markery, které by částice od sebe jednoznačně odlišovaly, a pokud není pomocí zobrazovacích metod vyloženě zachycena biogeneze, je ISEV doporučováno používat obecné označení EV (Théry *et al.*, 2018). Dělení dle původu je zjišťováno na základě povrchových markerů typických pro populaci mateřských buněk (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014).

První zmiňovanou skupinou jsou exosomy (30-150 nm), které vznikají intracelulárně invaginací pozdního endosomu, tím vznikají váčky označované jako intraluminální vesikuly (ILV; *intraluminal vesicles*) (Hurley, 2008). Endosom naplněný ILV se označuje jako multivesikulární tělísko (MVB; *multivesicular body*). MVB splnutím s lysozomem může vést k degradaci ILV, nebo se fúzí s cytoplasmatickou membránou buňky dostávají ILV do extracelulárního prostoru, kde jsou nazývány právě exosomy (Trajkovic *et al.*, 2008, Gandham *et al.*, 2020). Mechanismus vzniku ILV se v zásadě rozděluje podle toho, zda je využíván endosomální třídící komplex potřebný pro transport (ESCRT, *endosomal sorting complex required for transport*). ESCRT závislá dráha využívá ubiquitinace proteinu, určeného pro uzavření do vesikulu. ESCRT komplexy rozpoznají ubiquitinovaný náklad a regulují invaginaci membrány a tvorbu vesikulu v MVB (Hurley, 2008). ESCRT nezávislá dráha je závislá na sfingolipidovém ceramidu. Lipidové rafty bohatší na kuželovité ceramidy vyvolají spontánní zakřivení membrány a podporují tvorbu vesikulů (Trajkovic *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2019).

Mikrovesikuly (100-1000 nm) vznikající přímo pučením buněčné membrány (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014). Mikrovesikuly a exosomy mívají podobný náklad, povrchové znaky a překrývají se v rozpětí velikosti. Proto je v podstatě nemožné je od sebe analýzou nebo izolací rozpoznat bez pozorované biogeneze (Gandham *et al.*, 2020). Další podskupinou EV jsou apoptotická tělíska (obvykle ≥ 1000 nm), která vznikají v pozdních fázích apoptózy buněk (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014). Obecně bývají největší ze všech EV, mohou nést i buněčné organely a na svém povrchu mají největší zastoupení fosfatidylserinu (Gandham *et al.*, 2020). Zvláštní skupinou EV jsou onkosomy, neboli EV odvozené od nádorových buněk (van Niel *et al.*, 2022). V některých případech bývá k EV řazena ještě skupina exomery (< 50 nm), což jsou částice pouze s jednou vrstvou membrány (Gandham *et al.*, 2020) a v rozsahu této práce jsou zanedbatelné.

Díky různé biogenezi jsou EV hodně heterogenní ať už ve velikosti, složení, povrchových markerech nebo ve funkci. Je složité jednoznačně určit biogenezi u sledovaných EV a jejich popis se tak raději zaměřuje na více faktorů. ISEV proto doporučuje shrnující pojmenování EV doplněné o analyzované faktory, jako je např. velikost a přítomnost specifických buněčných znaků (Théry *et al.*, 2018; Gandham *et al.*, 2020).

2.1.2 Funkce EV

EV slouží k mezibuněčné komunikaci a přispívají k fyziologickým i patologickým stavům v organismu (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014). Jejich funkce závisí na povrchových molekulách, vnitřním obsahu a může odrážet stav mateřské buňky (Record *et al.*, 2014). Komunikaci mohou zprostředkovávat přímou interakcí povrchových molekul s receptory cílových buněk, případně dopravením přenášeného materiálu do jejich nitra (Mathivanan *et al.*, 2010).

Vnitřní materiál z EV, jako jsou proteiny, lipidy i nukleové kyseliny, se do cílových buněk dostává různými mechanismy. Membrána EV může fúzovat s cílovou membránou a tím se obsah dostane přímo do cytosolu buňky (Mathivanan *et al.*, 2010). Celé EV mohou být do cílové buňky dopraveny i pomocí endocytózy zprostředkované klathrinem i caveolinem (Mulcahy *et al.*, 2014). Povrchový fosfatidylserin podporuje přijetí EV fagocytózou, malé exosomy mohou být přijaty makropinocytózou (Mathieu *et al.*, 2019).

Komunikací přispívají EV k běžným fyziologickým procesům organismu. EV odvozené od kmenových buněk mohou například pomáhat s regenerací poškozené tkáně (Robbins, 2017). Během zrání erytrocytů je pomocí EV odstraňován veškerý materiál, který už krvinka nepotřebuje (Géminard *et al.*, 2004). Kupferovy buňky v játrech vychytávají EV odvozené od červených krvinek, které obsahují hemoglobin. Průchod játry tak snižuje erytrocytální EV v oběhu (Willekens *et al.*, 2005). Prostatosomy, což jsou EV uvolňované epiteliálními buňkami prostaty, mohou v ejakulátu pomáhat při oplození vajíčka a chránit spermie před imunitním systémem v reprodukčním traktu žen (Aalberts *et al.*, 2014). Přenesení funkční mRNA a miRNA pomocí EV mění chování cílové buňky (Valadi *et al.*, 2007). EV se účastní i mechanismů imunity. EV odvozené od neutrofilních granulocytů působí protizánětlivě na makrofágy a pomáhají ukončovat zánětlivou reakci (Gasser & Schifferli, 2004). EV odvozené od antigen prezentujících buněk mohou na svém povrchu nést hlavní histokompatibilní komplex II (MHC, *major histocompatibility complex*) s navázaným antigenem a účastnit se antigenní prezentace T-lymfocytům (Raposo *et al.*, 1996; Milane *et al.*, 2015; Mathieu *et al.*, 2019).

Zprostředkováním mezibuněčné komunikace se EV účastní i patologických procesů v organismu. Rakovinné buňky pomocí EV přenášejí onkogenní aktivitu (Al-Nedawi *et al.*, 2008), mají metastatický potenciál a přispívají invazivitě nádorů. Z nádorového

mikroprostředí odnáší léčiva (Milane *et al.*, 2015). V CNS pomáhají šířit neurodegenerativní onemocnění přenosem chybně sbalených amyloidů u Alzheimerovy choroby, prionů u infekčních prionóz (Record *et al.*, 2011) nebo α -synukleinu u Parkinsonovy choroby (Upadhya & Shetty, 2021). Náklad EV odráží stav mateřské buňky, jsou proto studovány jako možný biomarker pro diagnostiku a monitoring onemocnění (Gandham *et al.*, 2020). V posledních letech jsou EV studovány rovněž jako možný nástroj pro dopravu léčiv do místa určení (Record *et al.*, 2011; Gandham *et al.*, 2020), protože membrána chrání náklad před enzymatickou degradací v extracelulárním prostoru a povrchové proteiny by mohly pomáhat s dopravou nákladu na požadované místo (Mulcahy *et al.*, 2014).

2.2 Metody práce s EV

2.2.1 Izolace EV

EV mohou být pro účely analýzy izolovány ze všech tělních tekutin (Szatanek *et al.*, 2017). Nejčastějším materiálem pro izolaci je krev, kde se vyskytují v množství 10^4 - 10^{12} EV na ml plasmy (Coumans *et al.*, 2017). V krvi je ale vysoká koncentrace i jiných podobně velikých částic, jako proteinové agregáty, lipoproteiny, chylomikrony, cholesterolové částice apod. (Gandham *et al.*, 2020). Dalším častým materiálem pro izolaci EV jsou kondicionovaná média buněčných nebo tkáňových kultur. Při jejich analýze se doporučuje použití bezsérových médií, protože samotné sérum obsahuje vlastní EV. Rovněž se při analýze doporučují kontroly analýzy vlastního média (Théry *et al.*, 2018).

Nejčastější metodou izolace je ultracentrifugace, která však může způsobovat agregaci EV (Gardiner *et al.*, 2016). Dále je využívána sériová diferenciální centrifugace (Van Deun *et al.*, 2017), kdy se nejprve při $1500 \times g$ oddělí přítomné buňky a debris a následně při odstředivé síle 10000 – $20000 \times g$ velké EV. Malé EV se oddělují do peletu až při ultracentrifugaci rychlostí při stovkách tisíc $\times g$ (Coumans *et al.*, 2017). Kvůli odstranění destiček při přípravě plasmy se doporučuje dvojitá centrifugace. Zopakováním centrifugace ve fosfátovém pufru (PBS, *Phosphate-buffered saline*) může dojít k odmytí rozpustných proteinů, lipidové částice a proteinové agregáty však ve vzorku zůstávají (Gandham *et al.*, 2020). Dalšími způsoby izolace jsou precipitace EV pomocí polymerů (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014), filtrace, nejčasněji na celulózových filtrech, díky kterým se oddělí větší částice (Gandham *et al.*, 2020), nebo izolace pomocí gelové či afinitní chromatografie (Gardiner *et al.*, 2016).

Je důležité při zpracování materiálu pracovat standardně a zapisovat veškeré kroky, aby mezi vzorky nevznikaly rozdíly, které by mohly vést ke zvýšené tvorbě, ale i rozpadu EV. Je nutné standardizovat odběr materiálu, izolační postup, centrifugace, kroky zmrazení a rozmrazení, definovat celkový stav pacienta, denní dobu odběru apod. (Gandham *et al.*, 2020). Už samotný odběr může aktivovat krevní destičky a zvýšit tak ve vzorku počet EV od nich odvozených (Coumans *et al.*, 2017). Použití různých antikoagulantů při odběru krve může rovněž ovlivnit množství EV ve vzorku. Například heparin způsoboval při míchání odebrané plné krve nárůst počtu EV ve vzorku, oproti použití ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*) nebo citrátu

sodného (Fendl *et al.*, 2016). Citrát sodný jako antikoagulant měl při pokojové teplotě stabilní výsledky po dobu 8 hodin, po 24 hodinách se počty EV ve vzorcích zvyšovaly. EDTA ukázala naopak větší stabilitu při skladování 48 hodin při pokojové teplotě u destičkových a erytrocytárních EV. Citrát sodný je doporučený při okamžitém zpracování, zatímco EDTA pro dlouhodobější skladování vzorku (Wisgrill *et al.*, 2016) nebo pro analýzu RNA z EV (Coumans *et al.*, 2017). Množství EV se zvyšuje při aktivaci koagulace, proto je pro analýzu lepší použití plasmy než séra. Přítomnost Ca^{2+} rovněž podporuje nárůst počtu EV odvozených od krevních destiček (Aatonen *et al.*, 2014).

2.2.2 Analýza EV

Zcela specifické markery pro charakterizaci EV nejsou známy (Tannetta *et al.*, 2014). Jako markery EV se používají tetraspaniny, to jsou membránové proteiny účastníci se adheze a komunikace vazbou s buněčnými receptory. Tetraspaniny časté pro EV jsou diferenciacní antigen 9 (CD, *cluster of differentiation*), CD63 a CD81 (Mathivanan *et al.*, 2010; Mulcahy *et al.*, 2014). V exosomech se vyskytují také 70kDa proteiny tepelného šoku (HSP70, *70 kDa Heat Shock Proteins*), jejichž přítomnost je rovněž často ověřována při analýze (Géminard *et al.*, 2004; Gandham *et al.*, 2020). Složení EV vychází ze složení mateřských buněk, samotná analýza EV tak může vycházet ze značení markery typickými pro určitou buněčnou populaci (Szatanek *et al.*, 2017).

Nejčastější metody pro analýzu EV jsou průtoková cytometrie, transmisní elektronová mikroskopie (TEM, *Transmission electron microscopy*), kryo-elektronová mikroskopie, analýza sledování nanočástic (NTA, *nanoparticle tracking analysis*), nebo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Tannetta *et al.*, 2014; Göhner *et al.*, 2015). Další metodou mohou být mikroskopie atomárních sil nebo ramanova spektroskopie (Szatanek *et al.*, 2017). Proteiny a nukleové kyseliny v EV jsou analyzovány pomocí elektroforézy, proteiny pak také western blottingem, RNA v EV je ověřována i sekvenováním (Gandham *et al.*, 2020).

Při TEM ovlivňuje příprava vzorku tvarovou morfologii EV. Vlivem fixace a negativního značení sloučeninami těžkých kovů dochází ke zborcení membrány, díky čemuž mají EV mističkový tvar místo sférického (Szatanek *et al.*, 2017; Coumans *et al.*, 2017). Kryo-elektronová mikroskopie studuje vzorek fixovaný ve skelném ledu při teplotě tekutého dusíku a nedochází u toho ke změně morfologie. Zobrazované EV díky tomu mají

sférický tvar a metodu lze využít i k zachycení biogeneze EV (Gandham *et al.*, 2020). Vedle sférických EV se v plasmě vyskytují i tubulární, které byly zachyceny právě díky kryo-elektronové mikroskopii (Arraud *et al.*, 2014). Vzhledem ke způsobu přípravy vzorku a jeho sorpci na síťku se TEM nehodí jako metoda pro kvantitativní analýzu, ale hojně se používá společně s jinými metodami jako důkaz přítomnosti EV a popisu jejich morfologie (Coumans *et al.*, 2017). Kvantitativní analýza EV pomocí průtokové cytometrie bude jako stěžejní metoda popsána v samostatné kapitole.

2.2.3 Pozorované rozdíly počtu EV při onemocnění

Povrchové proteiny a lipidy i vnitřní obsah EV mohou odrážet stav, který v organismu probíhá (Record *et al.*, 2014). V různých studiích analyzujících EV v kohortách pacientů s různými chorobami byl sledován rozdíl v počtech EV, jejich složení nebo povrchových markerech (Gandham *et al.*, 2020).

V posledních letech bylo opublikováno velké množství studií analyzujících EV v tělních tekutinách onkologických pacientů. V krvi pacientů s kolorektálním karcinomem byly sledovány vyšší hladiny CD147⁺CD9⁺ EV oproti zdravým kontrolám (Yoshioka *et al.*, 2014). Rovněž byla zvýšena hladina miRNA v EV, které byly izolovány z krevní plasmy pacientů s kolorektálním karcinomem na základě přítomnosti epiteliální buněčné adhezivní molekuly (EpCAM, *epithelial cell adhesion molecule*) a po chirurgickém odstranění karcinomu se rozdíl jejich hladin oproti zdravým kontrolám ztrácel (Ostrenfeld *et al.*, 2016). U pacientů s karcinomem plic se hladiny izolované miRNA z EV odlišovaly i u různých stádií rakoviny (Jin *et al.*, 2017). U pacientů s melanomem byla v plasmě vyšší hladina EV exprimujících caveolin-1 než v plasmě zdravých kontrol. U pacientů podstupujících chemoterapii byla hladina caveolin-1⁺ EV nižší než u pacientů s melanomem, u kterých zatím nedošlo k léčbě (Logozzi *et al.*, 2009). U pacientů s karcinomem slinivky byly v krvi zvýšené EV odvozené od krevních destiček oproti pacientům s benigním onemocněním slinivky. Rozdíl v hladinách destičkových EV byl zaznamenán u pacientů s karcinomem slinivky i oproti pacientům s jiným druhem rakoviny, jako kolorektální karcinom (Mege *et al.*, 2016). Prostatosomy byly zvýšeny v ejakulátu mužů s rakovinou prostaty, oproti zdravým mužům (Aalberts *et al.*, 2014). EV odvozené od nádorů mohou svým nákladem nukleových kyselin, proteinů a lipidů přispívat k šíření a progresu onemocnění (Ruivo *et al.*, 2017). Vzhledem k odlišným hladinám EV a jejich odlišnému obsahu mohou být EV odvozené od nádorů prognostickým ukazatelem

v klinické praxi (Milane *et al.*, 2015). U metastazujících nádorů se jako prognostický materiál využívají cirkulující nádorové buňky v krvi, jejichž přítomnost koreluje s prognózou pacienta (Nanou *et al.*, 2018). Jejich množství ve vzorku je ale extrémně nízké, v řádech jednotek buněk na odebraný vzorek a prognóza tím může být zkreslená. Oproti tomu množství EV odvozených od rakovinných buněk je daleko větší a jejich počet ve vzorku stabilnější. Prognostika onemocnění zaměřená na analýzu EV by tak v budoucnu mohla být přesnější (Nanou *et al.*, 2020).

Hladiny destičkových (Tamagawa-Mineoka *et al.*, 2010) a endotelových EV v krvi byly zvýšené u pacientů s psoriázou oproti zdravým kontrolám. Korelace se závažností psoriázy ale nebyla pozorována (Pelletier *et al.*, 2011). Destičkové EV měly zvýšenou hladinu i v krvi pacientů s diabetem typu II a na jejich množství neměla vliv obezita pacientů (Zhang *et al.*, 2014). U těhotných žen s preeklamsií (P-Ec, *preeclampsia*) byla v krvi pozorována vyšší hladina EV odvozených od placenty, než u žen s fyziologickým těhotenstvím (Foster *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2020). Počet destičkových EV v periferní krvi byl zvýšený u pacientů s infekcí koronaviru souvisejícího s těžkým akutním respiračním syndromem 2 (SARS-CoV-2; *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*) oproti zdravým kontrolám a byly při pandemii koronavirového onemocnění 2019 (COVID-19; *coronavirus disease 2019*) sledovány jako možný biomarker případné predikce respiračních obtíží (Cappellano *et al.*, 2021).

Celkový nárůst EV v krvi je spojený i s fyzickou aktivitou. Jejich počet opět klesá na původní hodnotu před cvičením po 90 minutách v klidu (Frühbeis *et al.*, 2015). Je důležité brát na vědomí, že množství a velikost EV v krvi se mění během dne a hladina může být ovlivněna různými faktory, jako je pohyb, doba uplynulá od posledního jídla nebo pohlaví jedince (Danielson *et al.*, 2016). Sledované rozdíly hladin EV v různých tělních tekutinách však přináší možnosti diagnostiky nebo prognostiky různých onemocnění.

2.3 Roztroušená skleróza

MS je chronická, orgánově specifická autoimunitní choroba CNS spojená s demyelinizací neuronů (Confavreux *et al.*, 1980) a poškozením oligodendrocytů (Dobson & Giovannoni, 2019). Klinické projevy jsou různé a rozlišují se podle rychlosti progresu onemocnění. Nejčastější formou (až 90 % případů) je relaps-remitující MS, která se projevuje střídáním oddělených epizod zhoršení stavu, při které dochází k demyelinizaci neuronů v zánětlivé oblasti CNS (relaps) a následnou remisí, při které dojde ke zlepšení a částečné regeneraci tkáně (Hauser & Cree, 2020). Další formou může být progredující MS, kdy dochází k postupnému zhoršování bez remisí. Progresivní forma může být primární (asi 10 % případů), což je forma MS, která se vytrvalým zhoršováním projevuje od začátku onemocnění, nebo sekundární, která se vyvíjí z relaps-remitující po několika letech (běžně po 10-15) při postupném celkovém zhoršování stavu (Dobson & Giovannoni, 2019).

Přesný důvod onemocnění není dosud známý (Hauser & Cree, 2020), ale významný vliv hraje interakce genů (Ebers *et al.*, 1986) i prostředí (Bernard & de Rosbo, 1992). Riziko onemocnění souvisí s nižším množstvím vitamínu D v séru, kouřením, obezitou v dětství nebo předchozí infekcí virem Epstein-Barrové (Dobson & Giovannoni, 2019). K výskytu onemocnění dochází nejčastěji mezi 20. a 50. rokem života jedince (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014). MS se až 3× častěji projevuje u žen než u mužů (Dobson & Giovannoni, 2019). U žen v těhotenství se snižuje výskyt relapsů, a k největšímu zlepšení dochází ve 3. trimestru těhotenství. Po porodu se relapsy vrací a zhruba rok po porodu je stav onemocnění ve stejném stavu jako před otěhotněním (Confavreux *et al.*, 1998).

Při vývoji nemoci dochází k interakci endotelu, leukocytů, monocytů a buněk CNS. Aktivaci imunitního systému napomáhá prozánětlivé cytokinové prostředí tvořené faktorem nekrotizujícím nádory (TNF, *tumor necrosis factor*) α , interferonem (IFN, *interferon*) γ , nebo interleukinem (IL, *interleukin*) 1β a zvýšenou expresí adhezivních molekul (VCAM-1, E-selectin, a PECAM-1) (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014). MS se primárně považuje za autoimunitní onemocnění zprostředkované T buněčnou odpovědí, ale i léčba vedená cíleně proti aktivitě B-lymfocytů vede ke zlepšení projevů. Nálezy CNS jsou ve formě sklerózových plaků a zánětlivé oblasti jsou bohaté na CD8⁺ T-lymfocyty. V nižším počtu se v infiltrátech vyskytují i plasmatické a B buňky (Dobson & Giovannoni, 2019). Typickými

symptomy jsou problémy s viděním, únava, dysfunkce močového měchýře, problémy s chůzí a motorikou, ataxie, bolesti, deprese a další. K rozvoji onemocnění však dochází často i několik let před objevením prvních příznaků (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014; Dobson & Giovannoni, 2019; Hauser & Cree, 2020).

2.3.1 Současná diagnostika MS

Původní diagnostika MS se opírala převážně o projevy onemocnění a vyloučení všech ostatních onemocnění s podobnými projevy. Výsledná diagnóza bývala odhalena až při pitvě a byla zaznamenávána vysoká chybovost při určení MS, ale i při jejím vyloučení. Dnes je pro udržení kvality života pacienta potřebný časný nástup léčby, k čemuž už je nezbytná správná a včasná diagnóza (Bove & Hauser, 2018). V současné době se diagnostika opírá o zobrazovací metody, převážně magnetickou rezonanci (Thompson *et al.*, 2018). K určení diagnózy se vychází z McDonaldových kritérií (McDonald *et al.*, 2001), která byla postupně revidována podle aktuálních nároků (Polman *et al.*, 2005; Polman *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2018).

Základ diagnózy se opírá o celkovou anamnézu a nález na magnetické rezonanci. K diagnóze je zapotřebí prokázání šíření demyelinizačních lézí v čase i prostoru. Šíření v prostoru je definováno alespoň jednou lézí v alespoň dvou oblastech CNS typických pro MS, což jsou juxtrakortikální, periventrikulární, infratentoriální a míšňí oblast (Polman *et al.*, 2011). Diseminace v čase ukazuje rozdíly na snímcích pořízených alespoň s rozestupem 30 dnů. Současně musí být vyloučeny ostatní diagnózy s podobnými projevy, jako je oční neuritida, nebo těžké neuropatie (Polman *et al.*, 2011).

V případě nejasných výsledků po vyšetření pomocí magnetické rezonance je doporučováno doplnění vyšetření CSF. Takové vyšetření se zaměřuje na hledání oligoklonálních pásů imunoglobulinu (Ig, *immunoglobulin*) G na elektroforézovém gelu z CSF. K podpoření diagnózy MS je zapotřebí nalézt 2 proužky IgG v CSF, které se nenachází v séru stejného pacienta, což podporuje průkaz lokální syntézy IgG v CNS (Thompson *et al.*, 2018). Vyšetření CSF se doporučuje i v případě, kdy není možné získání důkazů o diseminaci v čase nebo prostoru, nebo jsou výsledky nejasné (Filippi *et al.*, 2016). Výskyt oligoklonálních IgG pásů v CSF není jednoznačné kritérium a bez ostatních projevů se určuje jako možné riziko rozvoje MS (Dobson *et al.*, 2013).

Je stálá snaha o zjednodušení McDonaldových kritérií pro snížení možné chybné diagnózy. Je potřeba odlišit MS od neuromyelitidy a poruch optického spektra. U pacientů mladších 11 let je poměrně častý výskyt akutní encefalomyelitidy, při které mají pacienti nálezy splňující McDonaldova kritéria a může tak poměrně snadno dojít k chybné diagnóze. Stále není žádný jednoznačný znak nebo klinický test k přesné diagnóze MS. Další výzkum je proto směřován k hledání neurofyziologických markerů v tělních tekutinách (Thompson *et al.*, 2018).

2.3.2 Léčba MS

Léčba MS se zaměřuje převážně na modulaci imunitního systému. Při relapsech se imunitní odpověď potlačuje pomocí vysokých dávek kortikosteroidů (Smets *et al.*, 2017). Další imunomodulační léčbou je intravenózní podávání IFN- β nebo glatimer acetátu. Podávání Teriflunomidu inhibuje enzym dihydroorotát dehydrogenázu, čímž se redukuje syntéza pyrimidinu, který je důležitý pro proliferaci lymfocytů (Dobson & Giovannoni, 2019). Cílená léčba MS zahrnuje například Fingolimod. Ten se *in vivo* přeměňuje na S-fingolimodfosfát, který se s vysokou afinitou váže na sfingosin-1fosfátové (S1P, *sphingosine 1-phosphate*) receptory, čímž brání výstupu lymfocytů z lymfatických uzlin do periferního oběhu. Vazbou se rovněž na lymfocytech snižuje exprese S1P receptorů (Scott, 2011). Podobný mechanismus účinku má Siponimod, který moduluje přímo S1P receptor. Monoklonální protilátky proti CD20, jako Ofatumumab nebo Ocrelizumab, vedou k depleci B-lymfocytů (Hauser & Cree, 2020). Natalizumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti integrinu $\alpha 4\beta 1$ (také VLA-4), čímž brání adhezi a prostupu lymfocytů do CNS (Dobson & Giovannoni, 2019). Další používanou léčbou je Alemtuzumab, protilátka proti CD52, který se vyskytuje na zralých lymfocytech, ale v menším množství i na dalších buňkách imunitního systému, jako makrofágy, monocyty nebo přirozený zabíječ (NK, *natural killer*) (Willis & Robertson, 2016).

Vedle cílené léčby MS se v pozdějších stádiích onemocnění a při progresích přidává také symptomatická léčba, která se zaměřuje na léčbu a zmírnění symptomů, které se objevují v důsledku poškození CNS. Anticholinergika se podávají při dysfunkci močového měchýře, analgetika proti bolesti, často se přidávají i antidepresiva a podobně (Dobson & Giovannoni, 2019).

Zajímavé poznatky přináší sledované zlepšení průběhu onemocnění v těhotenství. Těhotenství podporuje proliferaci prekursorových buněk oligodendrocytů, díky čemuž se zvyšuje regenerační schopnost myelinu v mateřské CNS. Ukázalo se, že prolaktinová signalizace regulovala proliferaci prekursorů oligodendrocytů. Prolaktin byl proto diskutován jako možné terapeutické činidlo pro obnovu bílé hmoty u pacientů s MS (Gregg *et al.*, 2007).

2.3.3 EV v neurologii

Jak už bylo popsáno v předchozí kapitole (2.1.2.), EV přispívají k fyziologickým, ale i patologickým stavům v organismu. Stejně je tomu i v nervové soustavě. Při vývoji a neuronálním zrání vylučují oligodendrocyty EV, které regulují myelinizaci k umožnění neuronálního zrání a plného vývoje. EV odvozené od oligodendrocytů chrání přežití neuronů při stresu (Lai & Breakefield, 2012). Při úrazech zbavují EV neurony toxických proteinů. V případě poškození neuronů slouží EV také jako prostředek přenosu ribosomu a mRNA ze Schwannových buněk do poškozených neuronů a podporují tím syntézu proteinů pro regeneraci (Court *et al.*, 2011). EV v nervové soustavě však také působí jako přenašeče chybně sbalených patologických proteinů, jejichž přítomností vznikají oligomery ukládající se v mozku a snižující neuronální funkce, které vedou až k apoptóze neuronů. Přispívají tak k přenosu amyloidu β , který agreguje v CNS při Alzheimerově chorobě a jehož nerozpustné plaky jsou neurotoxické. U Parkinsonovy choroby dochází k ukládání α -synukleinu, který se mezi buňkami také může přenášet pomocí EV (Sáenz-Cuesta *et al.*, 2014) U infekčních prionóz se pomocí EV přenáší infekční prionový protein (Record *et al.*, 2011).

Nádorové buňky vylučují EV, které se účastní potlačení imunitních reakcí proti nádorovým antigenům, a to ať už přímou inhibicí, nebo při kompetici jako náhradní cíl imunitní odpovědi (Lai & Breakefield, 2012). EV z nádorů často odnáší i chemoterapeutika dodávaná k léčbě. Současně jsou EV navrhovány jako možný vektor k přenosu léčiv (Gandham *et al.*, 2020). Mikroglie a makrofágy v CNS uvolňují EV, které šíří zánětlivé signály. V mozkomíšním moku i v krvi pacientů s MS byly pozorovány rozdílné hladiny EV ve srovnání se zdravými kontrolami (Carandini *et al.*, 2015). Rozdíly v počtech EV v periferní krvi byly popsány i u Alzheimerovy choroby, demence, epilepsie nebo po traumatech CNS (Lai & Breakefield, 2012). EV z dendritických buněk zajišťovaly v myším modelu experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE, *experimental*

autoimmune encephalomyelitis), modelu MS, komunikaci dendritických buněk a mikroglíí (Teo *et al.*, 2010). U myší s EAE bylo pozorováno zvýšené množství EV v séru v průběhu březosti a v souvislosti s tím byly sníženy projevy EAE. Exosomy v séru potlačovaly aktivaci T-lymfocytů, podporovaly zrání prekursorů oligodendrocytů a usnadňovaly jejich migraci do CNS. Exosomy izolované z březích samic snižovaly zánětlivou reakci u myší s EAE a snižovaly produkci IFN- γ (Williams *et al.*, 2013), TNF- α , IL-17 (Gatson *et al.*, 2011).

2.4 Předčasné porody

2.4.1 Klasifikace porodu dle gestačního věku

Porod je určen jako předčasný, pokud k němu dojde před 37. týdnem gestačního věku. Ve vyspělých zemích jsou předčasné porody s incidencí 7,5-12 %, v rozvojových i více než 15 % (Galinsky *et al.*, 2013). Nejvíce neonatálních úmrtí je v důsledku předčasných porodů (Liu *et al.*, 2016). Ve vyspělých zemích je předčasný porod důvodem až 70% úmrtnosti novorozenců. Příčinami předčasných porodů mohou být vícečetná těhotenství, záněty jako chorioamnionitida, úrazy matky, nebo uměle vyvolané porody z důvodu zachování bezpečnosti matky (Galinsky *et al.*, 2013).

2.4.2 Důvody předčasných porodů a chorioamnionitida

Předčasný porod může být spontánní, vyvolaný z důvodu mechanického poškození plodových obalů, způsobený vícečetným těhotenstvím, uměle vyvolaný z důvodu komplikací matky, jako krvácení nebo preeklampsie (P-Ec, *preeclampsia*), nebo z důvodu bakteriální infekce a zánětu (Galinsky *et al.*, 2013). Jedním z častých důvodů předčasných porodů je chorioamnionitida, neboli zánět plodových obalů, amnionu a chorionu. U těhotné ženy se projevuje jako horečka, tachykardie, citlivost dělohy a předčasné prasknutí plodových obalů, ale může probíhat i asymptomaticky. Zánět je způsoben přítomností mikroorganismů, které se do místa dostanou několika cestami. Nejčastěji se mikroorganismy do blízkosti plodových obalů dostávají z děložního čípku pochvy. Dalšími způsoby jsou přenos přes vejcovody, z krve matky přes placentu, nebo při invazivních prenatalních vyšetřeních, jako je odběr plodové vody neboli aminocentéza (Galinsky *et al.*, 2013; Spinillo *et al.*, 2014).

Bakteriální infekce plodových obalů vede k jejich předčasné ruptuře. Tomu napomáhá samotná přítomnost bakterií, které proteolytickými enzymy snižují pevnost a elasticitu plodových obalů, ale i přítomnost imunitních buněk. Neutrofilní granulocyty uvolňují v místě zánětu elastázy a kolagenázy, které rovněž narušují strukturu a pevnost plodových obalů. Současně zvýšená exprese prozánětlivých cytokinů jako IL-6, IL-1 α , TNF α a dalších vede k syntéze prostaglandinů a zahájení děložních kontrakcí (Spinillo *et al.*, 2014). Definitivní diagnostika chorioamnionitidy probíhá až po porodu pomocí histologických nálezů na pupeční šňůře nebo placentě (Galinsky *et al.*, 2013).

2.4.3 Komplikace předčasně narozených novorozenců

Vlivem předčasného porodu dochází k poporodním komplikacím novorozenců způsobených nedostatečným vývojem jedince. Nedostatečný vývoj se nejhojněji projevuje nedovyvinutím plic, které je spojováno se syndromem dechové tísně novorozenců (Gotsch *et al.*, 2007). Vývoj plic se ještě zpomaluje při intrauterinním zánětu. Nitroděložní zánět vede k abnormální srdeční činnosti plodu, tím se zhoršuje srdeční funkce a může dojít i ke snížení vývoje myokardu. Mozek předčasně narozených novorozenců není dostatečně vyvinutý a je u nich vyšší riziko neurologických problémů, jako opožděný vývoj řeči, poruchy učení nebo ztráta sluchu. Nižší srdeční aktivita novorozenců vede i ke snížení prokrvení mozku a jeho vývoje po porodu. Chorioamnionitida je spojená také s nedostatečným vývojem sítnice a s výskytem retinopatií u předčasně narozených novorozenců. Může ovlivnit i vývoj ledvin, které vede k jejich nedostatečné funkčnosti, ale i vývoji hypertenze v pozdějším věku (Galinsky *et al.*, 2013). V případě zánětlivých stavů spojených s chorioamnionitidou se u novorozenců rozvíjí syndrom fetální zánětlivé odpovědi (FIRS, *fetal inflammatory response syndrome*), který je obdobou systémového zánětu, nebo sepse u dospělých osob (Gotsch *et al.*, 2007).

Při FIRS se zvyšují koncentrace zánětlivých cytokinů. To vede ke špatným kardiopulmonálním a neurologickým výsledkům novorozenců. FIRS je způsoben přenosem bakterií plodovou vodou z plodových obalů, nebo pupečnickovou šňůrou z placenty (Gotsch *et al.*, 2007). Klinicky je FIRS definován jako koncentrace IL-6 v plasmě novorozence vyšší než 11 mg/l a histologicky jako fetální vaskulitida. U novorozenců s vyšším IL-6 je pozorována častější novorozenecká morbidita (Gomez *et al.*, 1998). Ke zlepšení přežití přispívá včasné podání glukokortikoidů k urychlení zrání orgánů, pro optimalizaci funkce plic se používají přetlakové ventilace (Galinsky *et al.*, 2013). U systémové infekce předčasně narozených novorozenců je nezbytná včasná diagnóza pro zjištění prognózy a zajištění potřebné léčby. Nejčastěji se k diagnostice používá jako marker IL-6, ale ideální je současné stanovení C reaktivního proteinu (CRP, *C-reactive protein*). Jako další diagnostický a prognostický ukazatel je sledován i prokalcitonin (PCT, *procalcitonin*), ale jeho souvislost s FIRS byla nejslabší (Berka *et al.*, 2021).

Přítomnost mikroorganismů v plodové vodě a plodových obalech může vést k přenosu infekce i na plod. Vdechnutí infikované plodové vody může rozvinout vrožený zápal plic, nebo meningitidu v horních dýchacích cestách. Kontaktem můžou být

infikovány oči, ve kterých se může rozvinou zánět, nebo kůže, což vyvolává dermatitidu plodu. Spolknutím infikované plodové vody se zřídka vyvíjí i novorozenecká gastritida (Spinillo *et al.*, 2014).

2.4.4 EV spojené s porody a reprodukci

EV hrají důležitou roli v reprodukci už před oplozením vajíčka (Tannetta *et al.*, 2014) a jejich význam je pozorován i po porodu v mateřském mléce (Admyre *et al.*, 2007). V reprodukčním traktu žen chrání kompeticí EV v ejakulátu spermií před fagocytózou a komplementem, čímž podporují početí (Tannetta *et al.*, 2014). Placenta vylučuje EV do krve matky (Tannetta *et al.*, 2017) i do pupečnickové krve (Campello *et al.*, 2015). Hlavní tkáň vylučující placentární EV je syncytiotrofoblast, tkáň povrchu placenty na fetomaternálním rozhraní (Tannetta *et al.*, 2017). V těhotenství podporují placentární EV toleranci plodu mateřským imunitním systémem (Mincheva-Nilsson & Baranov, 2014). Jedním z tolerogenních mechanismů je, že placentární EV vyloučené do krve matky nesou Fas ligand (FasL, *Fas ligand*), který inhibuje imunitní reakci proti placentě a plodu (Frängsmyr *et al.*, 2005). Placentární EV celkově snižují aktivaci T-lymfocytů (Sabapatha *et al.*, 2006) i reakce NK buněk (Tannetta *et al.*, 2017). Celkový počet EV odvozených od placenty stoupá v průběhu těhotenství v periferní krvi matky i pupečnickové krvi (Germain *et al.*, 2007; Mincheva-Nilsson & Baranov, 2010).

Velmi často studovaným tématem EV ve spojení s těhotenstvím a reprodukci jsou EV při P-Ec. P-Ec je stav, ke kterému dochází při těhotenství, je spojena s hyperkoagulací, endoteliální dysfunkcí, systémovým zánětem těhotných žen (Ghulmiyyah & Sibai, 2012) a zvýšenou produkcí IFN- γ oproti fyziologickému těhotenství (Germain *et al.*, 2007). Klinicky se projevuje nástupem hypertenze po 20. týdnu těhotenství, proteinurií, eventuelně poškozením jater, neurologickými problémy, placentární dysfunkcí a omezením růstu plodu (Tranquilli *et al.*, 2014). Celkově zhoršuje zdravotní stav matky a často vede k nucenému ukončení těhotenství nebo předčasnému porodu. V opačném případě dochází k úmrtí matky i plodu (Ghulmiyyah & Sibai, 2012). V periferní krvi těhotných žen s P-Ec byly sledovány vyšší hladiny EV odvozených od syncytiotrofoblastu (Knight *et al.*, 1998) i od krevních destiček (Lalic-Cosic *et al.*, 2021). Zvýšená sekrece EV z placenty byla u matek s P-Ec pozorována i během porodu, zatímco u porodu zdravých matek nebyl stejný trend pozorován (Reddy *et al.*, 2008). Nárůst placentárních EV při P-Ec byl sledován

i v pupečnickové krvi (Campello *et al.*, 2015). Placentární nebo destičkové EV v krvi těhotných žen mohou být diagnostickým ukazatelem P-Ec (Göhner *et al.*, 2015).

V posledních letech se začalo uvažovat, že by zvýšená hladina placentárních EV mohla být samotnou příčinou P-Ec, nikoliv pouhým důsledkem (Messerli *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2020; Lalic-Cosic *et al.*, 2021). Syncytiotrofoblastové EV zvyšovaly na monocytech expresi adhezivní molekuly CD54 a vyvolaly produkci prozánětlivých IL-6, IL-1 β a IL-8 (Messerli *et al.*, 2010). Na myším modelu byly EV z poraněné placenty přeneseny do březí myši, u které se následně vyvinuly příznaky shodné s P-Ec. Po podání Lactadherinu, který se váže na fosfatidylserin, došlo ke zvýšení fagocytózy EV a projevy P-Ec březí myši se zlepšily (Han *et al.*, 2020). Bylo pozorováno vyšší zastoupení fosfatidylserinu v membránách EV u žen s P-Ec oproti normálnímu těhotenství. Kladně nabitý fosfatidylserin podporoval vazbu protrombinových komplexů a tím zvyšoval koagulaci (Lalic-Cosic *et al.*, 2021).

U pacientek se syndromem polycystických ovarií bylo ve folikulární tekutině pozorováno snížené množství miRNA v EV oproti zdravým kontrolám (Sang *et al.*, 2013). EV izolované z mateřského mléka *in vitro* inhibovaly produkci IFN- γ a IL-2 a zvyšovaly počet regulačních T-lymfocytů (Admyre *et al.*, 2007). EV v mateřském mléce tak pravděpodobně ovlivňují imunitní reakce a podporují správný vývoj imunitního systému novorozenců (Foster *et al.*, 2016).

2.5 Cytometrie EV

2.5.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je běžně používaná metoda analýzy buněk a charakterizace jejich optických vlastností na základě rozptylu a odrazu světla při průchodu paprskem světelného zdroje (Adan *et al.*, 2017). Pozorovány jsou základní parametry jako velikost a granularita, doplněné o fenotypické odlišení na základě fluorescence, a to buď vlastní (autofluorescence), nebo dodané pomocí vazby protilátek s fluoroforem, případně pomocí jiných barviv (Kuiper *et al.*, 2020). Průtokové cytometry mohou být základní analyzátoři, nebo třídící cytometry (tzv. sortery), které na základě vybraných fenotypických znaků mohou oddělit námi vybranou populaci buněk (Adan *et al.*, 2017). Pro účely této práce budeme obecným pojmem průtoková cytometrie označovat základní analytickou metodu.

Základní parametry cytometrů jsou fluidika, optika a technika. Fluidika pohání připravený vzorek cytometrem pomocí proudu hnací tekutiny ke zdroji světla a pomocí hydrodynamické fokusace vzorek centralizuje (Adan *et al.*, 2017). Okolní hnací tekutina má vyšší průtok než vzorek a zvýšením rychlosti průtoku se zvýší i průměr toku samotného vzorku (Kuiper *et al.*, 2020). Optika cytometrů pak zajišťuje světelné zdroje a filtry, díky kterým se rozptyl světla a fluorescence přenáší na detektory, které zachycují analogový signál a převádí jej na digitální do elektroniky cytometru (Adan *et al.*, 2017). Hlavním zdrojem světla v cytometrii je laserový paprsek. Běžně se detekují dva směry rozptylu světla, a to přímý, nebo také dopředný rozptyl (FSC, *forward scatter*) a boční rozptyl (SSC, *side scatter*) (Kuiper *et al.*, 2020). FSC je difrakce světla podél osy laserového paprsku a obecně je úměrný velikosti procházející částice. Detektor FSC je chráněn před přímým působením laserového paprsku zatemňovací lištou. SSC je detekovaný pod úhlem 90° k laserovému paprsku a bývá úměrný tvaru a vnitřní složitosti měřených částic (Adan *et al.*, 2017).

Další parametry jsou získány díky detekci fluorescence. Fluorescenční látky mají definovanou vlnovou délku, při které přijímají energii světla, díky které dojde k přestupu elektronu do vyšší energetické hladiny a nastane tak excitovaný stav částice. Rychlým návratem elektronu do původní energetické hladiny se přebytečná energie částice vyloučí emisí ve formě fotonu o nižší energii a vlnové délce, než byl foton, který částici excitoval. Rozdíl mezi excitací a emisí se nazývá Stokesův posun (Adan *et al.*, 2017). Pro značení

fenotypických znaků měřených částic se používají nejčastěji protilátky proti antigenům dané částice s navázaným fluoroforem (Kuiper *et al.*, 2020). Intenzita emitované fluorescence se měří na detektorech umístěných kolmo k laserovému paprsku (Adan *et al.*, 2017). Navázání většího množství protilátek se stejným fluoroforem zvyšuje intenzitu fluorescence. Vedle protilátek se ke značení používají i různé generické značky, které se váží ke specifické struktuře. Příkladem je třeba Annexin V, nebo Lactadherin, které se váží na povrchový fosfatidylserin (Kuiper *et al.*, 2020).

2.5.2 Odlišnost cytometrické analýzy EV od analýzy buněk

Běžně používané cytometry jsou sestavené pro analýzu buněk. EV, které jsou z buněk odvozené, jsou daleko menší. Limitace analýzy EV je dána detekčním limitem cytometru a většina konvenčních cytometrů je schopná detekovat pouze částice větší než 500 nm (Szatanek *et al.*, 2017). Podle elektronové mikroskopie a NTA je více než 90 % EV ve velikosti pod 500 nm (Aatonen *et al.*, 2014). Běžně používané cytometry pro klinickou analýzu odhalují pouze menšinu EV (Arraud *et al.*, 2016). Nové nanoFCM jsou průtokové cytometry schopné identifikovat i částice s průměrem 100 nm. Při takovém nastavení jsou však limitované pro větší částice a zaznamenávají EV v rozmezí 100–500 nm (Danielson *et al.*, 2016).

FSC při analýze menších částic špatně rozlišuje EV ve vzorku od šumu pozadí. Možné řešení je přidání clony před FSC detektor, blokuje signál šumu z plášťové tekutiny (Arkesteijn *et al.*, 2020). Další možností je nastavení prahové hodnoty detekce mimo FSC a identifikace měřených částic pouze na základě fluorescence (Arraud *et al.*, 2015). Běžně používané řešení je odlišení velikosti malých částic na základě SSC. Novější analyzátoři mohou mít přidáný detektor rozptylu světla i pod jiným úhlem, díky čemuž jsou schopné lepšího rozlišení na základě velikosti (Robert *et al.*, 2012; Szatanek *et al.*, 2017). Citlivost SSC zvyšuje také menší vlnová délka laserového paprsku. Místo 488nm modrého laseru se pro analýzu EV doporučuje použití 405nm fialového laseru (Choi *et al.*, 2019; Gandham *et al.*, 2020). Přidání 405nm laseru a detektorů pro boční rozptyl na fialovém laseru (VSSC, *violet side scatter*) posunulo detekční limit cytometru a umožnilo detekci i 240 nm částic z oxidu křemičitého (Pekárková *et al.*, 2021).

Při analýze EV pomocí průtokové cytometrie je potřeba zamezit efektu roje. Efekt roje je situace při analýze, kdy hydrodynamickou fokusací vzniká centralizovaný proud

vzorku s vyšším průměrem, než je velikost částic. Proto může více částic procházet laserovým paprskem a detektor tyto částice zachytí jako jednu částici s fluorescencí z obou. Kvůli tomu může docházet k chybné interpretaci vzorku (van der Pol *et al.*, 2012; Szatanek *et al.*, 2017). Pro snížení možnosti efektu roje je ideální měření vysoce naředěného vzorku za nízké rychlosti průtoku, který snižuje průměr proudu vzorku (Kuiper *et al.*, 2020).

V tělních tekutinách jsou EV často velmi heterogenní. Velké množství možných mateřských buněk EV komplikuje rozlišení jednotlivých populací EV. Jedna tkáň může vylučovat velké množství různě velkých EV a odlišení populací na základě velikostí je nemožné (Kuiper *et al.*, 2020). Výhodou a důvodem pro používání cytometrie k analýze EV však zůstává možnost analýzy velkého množství EV v krátkém čase, dostupnost cytometrie v klinických laboratořích (Gasecka *et al.*, 2017) a možnost identifikace původu EV na základě fluorescenčního značení (Gandham *et al.*, 2020). Používají se protilátky proti běžným povrchovým antigenům mateřských buněk, ale jejich výskyt na EV je nižší. I signál fluorescence může být pod detekčním limitem cytometrů a pro zlepšení detekce se proto doporučují fluorofory s vyšším jasnem. Při výběru fluoroforů je také vhodné zamezit možnému překryvu emisních spekter. Problém s překryvem se při běžné analýze řeší kompenzací, která však pro analýzu EV není dostatečně vyvinutá a nemá při stejném nastavení potřebné kontrolní mechanismy (Kuiper *et al.*, 2020). Pro možnost značení EV a jejich odlišení od jiných nemembránových částic ve vzorku byly ověřovány generické barvy, které se zachytávají do membrán. Žádná z generických barev však neznačila všechny EV a výlučně jen EV (de Rond *et al.*, 2018b).

Z důvodu snížení detekce možného signálu pozadí, které má překryv ve velikosti s analyzovanými EV, je potřeba co nejvíc zamezit případným nečistotám ve všech používaných kapalinách. Hnací kapalinu je potřeba filtrovat (Foster *et al.*, 2016), stejně tak ředící pufr. Fluidika by měla mít navíc podobný refrakční index (RI, *refractive index*) jako ředící pufr, aby nedocházelo k rozptylu na pozadí (Kuiper *et al.*, 2020).

2.5.3 Řešení problémů při analýze EV

Na základě odlišností zmíněných v předchozí kapitole a zvyšujícímu se počtu publikací používajících průtokovou cytometrii k analýze EV navrhl Welsh *et al.* (2020a) panel minimálních informací potřebných pro možné porovnání výsledků napříč laboratořemi s různými cytometry (Welsh *et al.*, 2020a). Je potřeba zaznamenávat veškeré

předanalytické kroky, které by mohly ovlivnit výsledek, jako je způsob odběru vzorků a skladování. Při ultracentrifugaci tvoří například EV odvozené od krevních destiček agregáty, které nadhodnocují přítomnost velkých EV. Počet EV ve vzorku ovlivňuje také opakování cyklů zmrazení a způsob skladování. Při analýze je potřeba přípravu vzorků standardizovat, aby byly jednotlivé vzorky analýzy porovnatelné mezi sebou (Yuana *et al.*, 2015). Veškeré záznamy z průběhu přípravy analýzy jsou nezbytné také pro případnou reprodukovatelnost dat (Welsh *et al.*, 2020a).

K ověření velikosti měřených částic se nejčastěji používají kalibrační kuličky s definovanou velikostí a RI (van der Pol *et al.*, 2014a; Foster *et al.*, 2016). RI je poměr rychlosti světla ve vakuu k rychlosti světla v daném materiálu (Foster *et al.*, 2016). Je potřeba pamatovat, že rozptyl světla není ovlivněn pouze velikostí částic, ale i RI a absorpčním koeficientem. Vezikuly mají nízký RI a díky přítomnosti lipidů rozptylují světlo méně než polystyrenové nebo latexové částice, ze kterých se kalibrační kuličky často vyrábějí (Szatanek *et al.*, 2017). Průtokové cytometry mají výstupní data v arbitrárních hodnotách a mezi cytometry se výsledky mohou lišit. Kalibrační kuličky s definovanou velikostí a RI se doporučují k použití i pro standardizaci výsledků. Změření kalibračních kuliček na cytometru umožní vynesení kalibrační křivky, díky které se můžou výsledky z cytometru přepočítat na standardní veličiny (de Rond *et al.*, 2018a; Welsh *et al.*, 2020b). Pro kalibraci získaných dat jsou dostupné softwary jako FCM_{PASS} (Welsh *et al.*, 2020b), Rosetta Calibration (Kuiper *et al.*, 2020) nebo FCM Scatter-diameter Software (de Rond *et al.*, 2018a).

K zamezení efektu roje je doporučeno nastavení nižší rychlosti průtoku vzorkem. Pro ověření detekce efektu roje se doporučuje zařadit měření stejného vzorku v sériovém ředění (Coumans *et al.*, 2017). Pro ověření detekce šumu pozadí se navíc doporučuje zařazení kontrolního měření samotného ředícího pufru (Kuiper *et al.*, 2020). K ověření záchytu EV se přidává kontrolní měření vzorku s neionogenním detergentem, který rozpustí membrány EV, ale nikoliv agregáty proteinů. Snižující se záchyt měřených částic potvrzuje měření EV jako membránových částic (Coumans *et al.*, 2017). Pro ověření autofluorescence vzorků se používají nebarvené kontroly. Samotný používaný fluorofor může tvořit agregáty, které mohou zvyšovat falešnou pozitivitu vzorku. Jejich přítomnosti je zamezeno filtrací fluoroforů. Ověření případných agregátů je docíleno pomocí kontrol ve formě reagentů měřených pouze v pufru (Kuiper *et al.*, 2020).

3 Cíle práce

- Optimalizovat metodu detekce EV pomocí průtokové cytometrie
- Provést analýzu EV v periferní krvi u pacientů s MS a kontrol
- Provést analýzu EV v pupečnickové krvi u předčasně narozených novorozenců a donošených kontrol
- Ověřit přítomnost EV dalšími metodami, jako je elektronová mikroskopie nebo western blot

4 Materiál a metody

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Protilátky

Cílový antigen	Fluorofor	Isotyp	Výrobce	Klon	Katalogové číslo
CD3	PE	myší IgG1	Exbio	UCHT1	1P-514-T100
CD4	APC	myší IgG1	Exbio	MEM-241	1A-3T9-T100
CD8a	BV421	myší IgG1	Biolegend	RRA-T8	301036
CD20	BV421	myší IgG2b	Biolegend	2H7	302330
CD31	AF488	myší IgG1	Exbio	MEM-05	A4-273-T100
CD36	APC	myší IgG1	Exbio	TR9	1A-451-T100
CD41	BV421	myší IgG1	Biolegend	HIP8	303730
CD45	APC	myší IgG1	Exbio	MEM-28	1A-222-T100
CD62P	PE	myší IgG1	Exbio	AK4	1P-667-T100
CD105	BV421	myší IgG1	Biolegend	SN6h	800510
CD105	PE-Cy7	myší IgG1	Biolegend	43A3	323218
CD146	BV421	myší IgG1	Biolegend	P1H12	361004
CD146	PE-Cy7	myší IgG1	Biolegend	P1H12	361008
MBP	AF488	myší IgG1	Santa Cruz	F-6	SC-271524
MOG	AF647	myší IgG1	Santa Cruz	D-2	SC-376138
PLAP	PE	myší IgG1	LSBio	není uvedeno	LS-C65725
Syncytin-1	CF647	polyklonální králičí IgG	Biorbyt	polyklonální	ORB100573

Pokračování tabulky z předchozí stránky

Cílový antigen	Fluorofor	Isotyp	Výrobce	Klon	Katalogové číslo
IgG1	BV421	myší IgG κ	Biolegend	MOPC-21	400158
IgG1	PE	myší IgG κ	Exbio	MOPC-21	1P-632-C100
IgG1	APC	myší IgG κ	Exbio	MOPC-21	1A-632-C100
IgG1	AF488	myší IgG κ	Exbio	MOPC-21	A4-632-C100
IgG1	PE-Cy7	myší IgG κ	Biolegend	MOPC-21	400123
IgG2b	APC	myší IgG κ	Exbio	MPC-11	1A-692-C100

Tabulka 1: Seznam použitých protilátek pro průtokovou cytometrii. Zkratky: APC (Allofykocyanin, *Allophycocyanin*), AF (Alexa Fluor, *Alexa Fluor*), BV (Brilliant Violet, *Brilliant Violet*), CD (diferenční antigen, *cluster of differentiation*), CF (na cyaninu založené fluorofovy, *cyanine-based fluorescent dyes*), Cy (cyanin, *cyanine*), Ig (imunoglobulin, *immunoglobulin*), PE (fykoerytrin, *phycoerythrin*).

Cílový antigen	Fluorofor	Isotyp	Ředění	Výrobce	Klon	Katalogové číslo
CD41	žádný	myší IgG2b	1:500	Santa Cruz	B-9	sc-365938
CD105	žádná	myší IgG2b	1:200	Santa Cruz	P4A4	sc-20072
myší IgG	IR700	kozí	1:2500	Azure biosystems	polyklonální	AC2129

Tabulka 2: Seznam použitých protilátek pro metodu Western Blot. Zkratky: IR – infračervená (*infrared*)

4.1.2 Chemikálie

<u>Název</u>	<u>Výrobce</u>
• Albumin z hovězího séra (BSA, <i>Bovine serum albumin</i>); kat. č. R 80762	Carl Roth
• Dodecylsírán sodný (SDS; <i>sodium dodecyl sulfate</i>); kat. č. 71736-100ML	Bio-Rad
• Peroxodisírán amonný (APS; <i>Ammonium persulfate</i>); kat. č. 7727-54-0	Sigma
• Tetramethyldiamin (TEMED; <i>Tetramethylenediamine</i>); kat. č. 110-18-9	Sigma
• Glycerol, kat. č. G2025-1L	Sigma
• Uranyl acetát; kat. č. 541-09-3	Electron Microscopy Sciences
• Kyselina šřavelová; kat. č. 144-62-7	Sigma
• Hydroxid amonný, 25%; kat. č. 1336-21-6	Sigma
• Paraformaldehyd (PFA, <i>paraformaldehyde</i>); kat. č. 23700-31000	Penta
• Glutaraldehyd; kat. č. 23114.01	Serva
• Methylcelulóza; kat. č. 8421.1	Carl Roth
• Methanol; kat. č. 20038-AT0-M5000-1	Lach-Ner
• Merkaptoethanol; kat. č. M3148-100ML	Sigma
• Chlorid draselný (KCl); kat. č. 16210-31000	Penta
• Chlorid sodný (NaCl); kat. č. 16610-31000	Penta
• Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄); kat. č. 1051080250	Sigma
• Hydrogenfosforečnan sodný (Na ₂ HPO ₄); kat. č. 1065660500	Sigma
• Bromfenolová modř; kat. č. 21500-30010	Penta
• Glycin; kat. č. G8898-500G	Sigma
• Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris); kat. č. 252859-100G	Sigma
• Triton X-100; (TX100; <i>Triton X-100</i>) kat. č. X100-100ML	Sigma

4.1.3 Rostoky a další reagentie

- PBS
 - 0,00268 M KCl; 0,00147 M KH₂PO₄; 0,137 M NaCl; 0,00809 M Na₂HPO₄; pH 7,4
 - pro účely elektronové mikroskopie výrobce Lonza Bioscience, Kat. č.: BE17-516F
- PBS-BSA (0,1% (w/V) BSA v 1× PBS)
- Hemosol, výrobce Hemax diagnostika

- BD™ FACS Clean Solution, výrobce BD™ Biosciences, Kat. č.: 340345
- BD™ FACS Shutdown Solution, výrobce BD™ Biosciences, Kat. č.: 334224
- BD™ FACS Lysing Solution, výrobce BD™ Biosciences, Kat. č.: 349202
- CST (Cytometer Setup and Tracking beads), výrobce BD™ Biosciences, Kat. č.: 641319
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, výrobce Thermo Scientific, Kat. č.: 26617
- Fluoresbrite® YG Microspheres, Calibration Grade 6.00µm, výrobce: Polysciences, Kat. č.: 18862-1
- SPHERO™ Ultra Rainbow Quantitative Particle Kit, výrobce Spherotech, Kat. č.: URCP-38-2K
- Apogee Mix Calibration beads; výrobce Apogee Flow Systems, Kat. č.: 1493
- CellMask™ Deep Red plasma membrane stain; výrobce ThermoFisher Scientific; Kat. č.: C10046
- Bovine Lactadherine – FITC (fluorescein isothiokyanát, *fluorescein isothiocyanate*); výrobce Haematologic Technologies; Kat. č.: BLAC-FITC
- Syncytin-1 peptid; výrobce Biorbyt; Kat. č.: orb374808
- Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A, výrobce Thermo Scientific, Kat. č.: 23228
- Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B, výrobce Thermo Scientific, Kat. č.: 23224
- Akrylamid/bisakrylamid (37,5:1) 40 %, výrobce Bio-Rad, Kat. č.: 1610149
- Pufr A, pH 8,8 (1,875 M Tris, 0,5% SDS)
- Pufr B, pH 6,8 (0,625 M Tris, 0,5% SDS)
- Elektroforetický pufr (0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS)
- Transferový pufr (0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 10% (V/V) Methanol)
- Vzorkový pufr 5x (SB, *sample buffer*), (2 M Tris, 20% SDS, 50% glycerol, 0,5% bromfenolová modř)
- Lyzační pufr (0,5% TX100, 0,5% deoxycholát sodný, 50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)
- Blokovací pufr pro Western blot Azure (Azure Fluorescent Blot Blocking Buffer), výrobce Azure Biosystems, Kat. č.: AC2190
- Promývací pufr pro Western blot Azure (Azure IR Fluorescent Blot Washing Buffer), Azure Biosystems, Kat. č.: AC2145
- Uranyl acetát 4% (w/V)

- Methylcelulóza 2% (w/V)
- Uranyl oxalát, pH 7, (0,075 M šťavelové kyseliny, 2% (w/V) uranyl acetát filtrovaný přes 0,22 μ m filtr, pH upravené přidáním 25% hydroxidu amonného)

4.1.4 Další materiál

<u>Název, specifikace</u>	<u>Výrobce</u>
• Stericup® filtrační systém 0,1 μ m, 1000 ml, Kat. č.: SCVPU11RE	Merck Millipore
• Centrifugační mikrozkuřavky s filtrem Ultrafree 0,22 μ m, Kat. č.: UFC30GV0S	Merck Millipore
• BD Vacutainer® EDTA tube, K ₂ EDTA, Kat. č.: 367841	Becton Dickinson™
• FastCast Acrylamide kit, 12%, Kat. č.: 1610185	Bio-Rad
• Nitrocelulóřová membrána 0,2 μ m, Kat. č.: 1620112	Bio-Rad
• Amersham™ Hybond™ low fluorescence 0,2 μ m, Polyvinyliden difluorid (PVDF; <i>Polyvinylidene difluoride</i>), Kat. č.: 10600022	Cytiva™
• Měděné síťky pro elektronovou mikroskopii, Formvar/karbon, Kat. č. FCF200-Cu	Electron microscopy Science

4.2 Použitě přístroje

<u>Název, specifikace</u>	<u>Výrobce</u>
• Chlazená centrifuga 5810R; rotor FA-45-30-11	Eppendorf®
• Centrifuga Minispin® plus; rotor F-45-12-11	Eppendorf®
• Ultracentrifuga Optima LE-80K; rotor SW 40 Ti	Beckman Coulter®
• Průtokový cytometr BD FACS Canto™ II <ul style="list-style-type: none"> ○ Lasery: 488nm, 633nm, 405nm 	Becton Dickinson™
• Spektrofotometr BioSpectrometer® kinetic	Eppendorf®
• Spektrofotometr Victor ³ 1420-012 plate reader	Perkin-Elmer
• Elektroforetický zdroj PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
• Elektroforetická aparatura Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad
• Termostatický bloček CH-100	BioSan
• Transmisní elektronový mikroskop JEM 1011 <ul style="list-style-type: none"> ○ CCD kamera ○ Software Olympus Soft Imaging Solution GmbH 	JEOL Veleta

4.3 Metody

4.3.1 Titrace protilátek

K titraci protilátek proti markerům krevních destiček anti CD41-BV421, anti CD36-APC a anti CD62P-PE byla použita plná krev dárců odebraná do zkumavek s K₂EDTA a ředěná 20× v PBS s 0,1% BSA, pH 7,4 (PBS-BSA). Byla vytvořena dvojková ředící řada protilátky po 5 μl v PBS-BSA, do kterých bylo přidáno 45 μl 20× ředěné krve. Směs protilátky se vzorkem byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě ve tmě, promyta přidáním 1 ml PBS-BSA a vzorek byl centrifugován 1500 × g, 5 min, při pokojové teplotě. Pelet byl resuspendován ve 350 μl PBS-BSA a analyzován na BD FACS Canto II.

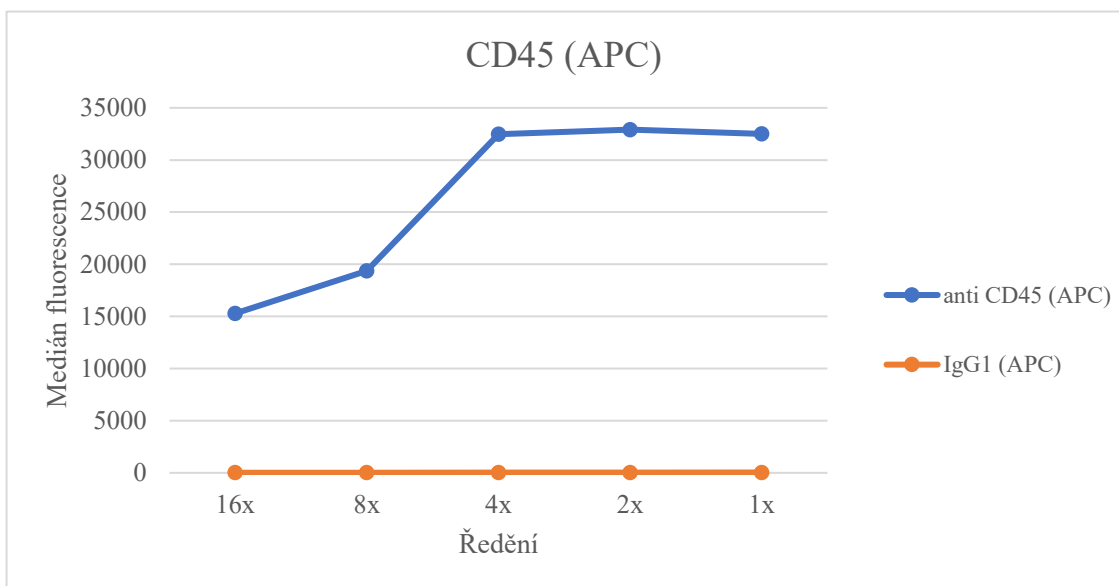
Protilátky anti CD45-APC a anti CD31-AF488 byly titrovány na krvi dárců odebrané do zkumavek s K₂EDTA. Z plné krve bylo odebráno 45 μl a přidáno k 5 μl protilátek v předem připravené dvojkové ředící řadě. Směs byla inkubována 25 min ve tmě při pokojové teplotě. Následně byla krev lyzována přidáním 0,5 ml 10× ředěného lyzačního roztoku (BD™ FACS Lysing Solution). Po 10 min byl přidán 1 ml PBS-BSA a směs centrifugována 500 × g, 10 min, 25 °C. Pelet byl resuspendován ve 350 μl PBS-BSA. Vzorky byly analyzovány na BD FACS Canto II.

Protilátky anti CD105-BV421, anti CD146-PE-Cy7, anti Syncytin-1-CF647 a anti PLAP-PE byly titrovány na buněčné linii lidských endoteliálních buněk pupečnickové žíly (HUVEC, *Human umbilical vein endothelial cells*) (získány od Mgr. Johanky Kučerové, BIOCEV). Z konfluentní kultury bylo odsáto médium a kultura byla inkubována s 5 ml 0,5mM EDTA v PBS 10 min na ledu a 10 min při 37 °C. Buňky byly resuspendovány a centrifugovány 500 × g, 3 min, 4 °C. Pelet buněk byl resuspendován v PBS-BSA na finální množství 2×10⁶ buněk/ml. Ze suspenze bylo odebráno 45 μl a přidáno k 5 μl připravené dvojkové ředící řady protilátek. Suspenze byla inkubována 30 min ve tmě na ledu. Po přidání 1 ml PBS-BSA byly vzorky centrifugovány 500 × g, 3 min, 4 °C, pelet byl resuspendován ve 300 μl PBS-BSA a vzorky změřeny na BD FACS Canto II.

Generická barva CellMask™ byla ověřena na buněčné linii PK1. Buněčná linie byla sklizena stejně jako HUVEC a 45 μl suspenze přidáno k 5 μl ředěného CellMask™.

Po 30 minutách inkubace byl ke směsi přidán 1 ml PBS-BSA, směs byla centrifugována $500 \times g$, 3 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, pelet resuspendován v $300 \text{ }\mu\text{l}$ PBS-BSA a vzorky analyzovány na BD FACS Canto II.

Společně s titrovanými protilátkami byly analyzovány i vzorky s odpovídající koncentrací isotypových kontrol. Data z měření byla vyhodnocena v programu FlowJo (10.7.1). Titrační křivky jsou vyjádřeny jako závislost mediánu intenzity fluorescence na ředění. Příklad titrační křivky znázorněn na obrázku 1. Výsledná koncentrace je znázorněna v tabulce 3.



Obrázek 1: Příklad titrační křivky protilátky CD45 (APC) na lyzované krvi.

Protilátka/čínidlo	Saturující koncentrace (μg/ml)
anti CD3 (PE)	6
anti CD4 (APC)	4,8
anti CD8a (BV421)	4,8
anti CD20 (BV421)	8
anti CD31 (AF488)	3,2
anti CD36 (APC)	5,2
anti CD41 (BV421)	2
anti CD45 (APC)	2,8
anti CD62P (PE)	5,2
anti CD105 (BV421)	10
anti CD105 (PE-Cy7)	40
anti CD146 (BV421)	10
anti CD146 (PE-Cy7)	12,5
CellMask™	10
Lactadherin (FITC)	33,2
anti MBP (AF488)	20
anti MOG (AF647)	40
anti PLAP (PE)	61,2
anti Syncytin-1 (CF647)	20

Tabulka 3: Používaná saturující koncentrace protilátek nebo generických barev pro průtokovou cytometrii.

4.3.2 Sběr vzorků

4.3.2.1 Vzorky periferní krve pro studii pacientů s MS

Pacientům s MS a jinými neurologickými potížemi byla odebrána periferní krev na Neurologické klinice všeobecné fakultní nemocnice (VFN) do odběrové zkumavky s K₂EDTA. Zdravým kontrolám byla odebrána krev na transfúzním oddělení VFN do zkumavky s K₂EDTA. Vzorky byly ihned přeneseny na Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK, kde byly centrifugovány 800 × g, 15 min, 24 °C. Plasma byla odebrána a centrifugována při 3200 × g, 15 min, 24 °C. Odebraný supernatant byl zmrazen na suchém ledu a uložen při -80 °C.

4.3.2.2 Vzorky pupečnickové krve pro studii předčasně narozených novorozenců

Po porodu v Ústavu pro péči o matku a dítě (ÚPMD) byl z pupečnickové žíly odebrán vzorek pupečnickové krve do směsi s 3,8% citrátem sodným (9:1) a okamžitě zpracován v biochemické laboratoři ÚPMD centrifugací 2800 × g, 15 min, 24 °C. Následně byl supernatant znovu centrifugován 2800 × g, 15 min, 24 °C. Alikvoty supernatantu byly zamrazeny v tekutém dusíku, dopraveny na suchém ledu na Ústav imunologie a mikrobiologie a skladovány při -80 °C.

4.3.3 Rozdělení patientských vzorků

4.3.3.1 Pacienti a kontroly pro studii MS

Celkem 130 vzorků plasmy bylo zařazeno do analýzy EV a rozdělených do skupin:

Pacienti s RS

- Nově diagnostikovaní pacienti (ND; n = 33)
- Pacienti s aktuálně změněnou léčbou (ZL; n = 22)
- Pacienti léčení Natalizumabem (N; n = 14)

Kontrolní skupiny

- Pacienti s jinými neurologickými potížemi, ale vyloučenou MS (NP; n = 36)
- Zdraví dárce krve (DK; n = 25)

4.3.3.2 Pacienti a kontroly pro studii předčasně narozených novorozenců

V části analyzující vzorky plasmy z pupečnickové krve u předčasně narozených novorozenců bylo použito 71 vzorků. Navíc bylo změřeno 9 vzorků, které byly vyřazeny z důvodu vysoké koncentrace hemoglobinu. Vzorky byly rozděleny podle gestačního věku a hodnoty IL-6:

Pacienti

- Předčasně narození novorozenci se zánětem (PTIN; n = 23; IL-6 > 12 mg/l)

Kontrolní skupiny

- Předčasně narození novorozenci bez zánětu (PT; n = 28; IL-6 < 11 mg/l)
- Donošení novorozenci (C; n = 20)

4.3.4 Průtoková cytometrie

4.3.4.1 Příprava analýzy a nastavení cytometru

Používané protilátky byly filtrovány pomocí centrifugačních mikrozkmavek s filtrem (0,22 μm) při 12000 \times g, 4 min v centrifuze Minispin®. Filtrační systém Stericup® s 0,1 μm membránou byl používán pro filtraci PBS-BSA a Hemosolu, který byl používán jako hnací kapalina průtokového cytometru. Cytometr byl nastaven na nízkou rychlost průtoku. Před každým měřením byl cytometr kalibrován pomocí CST kuliček a nastaven pomocí aplikačního nastavení pro stabilní měření v průběhu celé studie. S každým vzorkem byl měřen čistý pufr PBS-BSA (2 min), Apogee Mix Calibration beads (do naměření 15000 částic) a ve studii předčasně narozených novorozenců také SPHERO™ Ultra Rainbow Quantitative Particle Kit (do naměření 15000 částic). Cytometr byl před analýzou promýván pomocí PBS-BSA po dobu 5 minut při vysoké rychlosti průtoku.

Kanál	Napětí A (V)	Napětí B (V)
FSC	600	600
SSC	500	500
FITC	480	520
PE	530	650
PerCP	600	600
PE-Cy7	600	600
APC	600	500
AF700	700	700
VSSC	240	210
Pacific Blue	400	400
Práh detekce (VSSC)	700	200

Tabulka 4: Nastavení cytometru při analýze vzorků pro studii EV u pacientů s MS (Napětí A) a pro studii EV v pupečnickové krvi novorozenců (Napětí B). Původní nastavení, které mohlo být v den měření upravované softwarem podle výsledků CST kuliček.

4.3.4.2 Ověření rychlosti průtoku

Rychlost průtoku byla ověřena pomocí kalibračních kuliček Fluoresbrite® YG Microspheres, Calibration Grade 6.00 μm . Kalibrační kuličky byly naředěny pomocí PBS-BSA. Výsledný počet kuliček v připravené směsi byl vypočítán pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Ředěné kuličky byly následně měřeny na průtokovém cytometru 2 min, při nízké rychlosti průtoku. Měření bylo provedeno ve dvou nezávislých experimentech, ve dvou ředění kuliček a technických triplikátech. Z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná rychlost průtoku. Rychlost byla spočítána zvlášť pro analýzu EV u pacientů s MS a u EV v pupečnickové krvi novorozenců.

4.3.4.3 Příprava a analýza MS vzorků

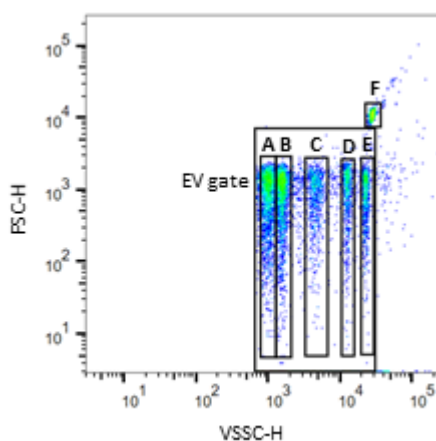
Vzorky byly rozmrazeny ve vodní lázni (37 °C, 8 min). 1,5 ml plasmy bylo stočeno při 14000 \times g, 70 min, 4 °C. Pelet byl resuspendován v 300 μl PBS-BSA. 30 μl vzorku bylo přidáno k 20 μl směsi obsahující protilátky, generické barvy a případně pufr. Jednotlivé zkumavky obsahovaly protilátky či barvy proti:

- Myelinovým proteinům – MBP (AF488), MOG (AF647)
- Endotelovým proteinům – CD31 (AF488), CD105 (PE-Cy7), CD146 (BV421)
 - Jako negativní marker byla přidána protilátka proti CD45 (APC)
- T-lymfocytům – CD3 (PE), CD4 (APC), CD8a (BV421)
- B-lymfocytům – CD45 (APC), CD20 (BV421)
- Krevním destičkám – CD36 (APC), CD41 (BV421)
- Fosfatidylserinu – Lactadherin (FITC)
- Negativní kontrola
- Isotypové kontroly

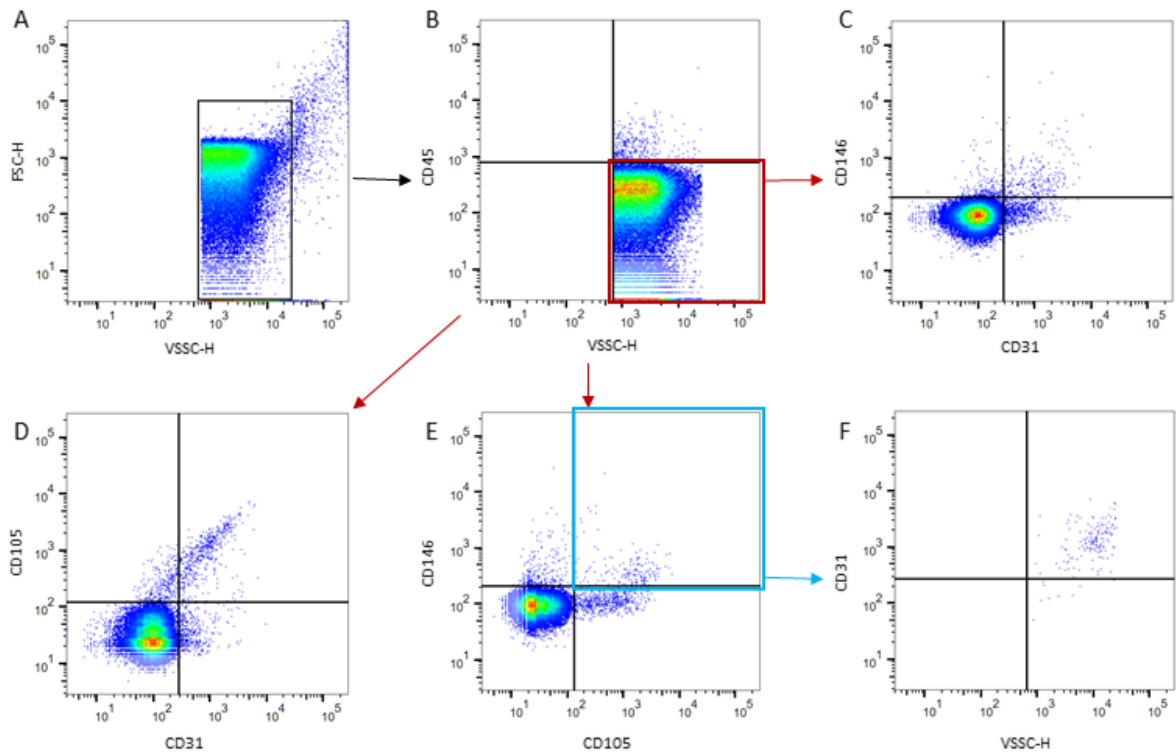
Vzorek s protilátkami byl inkubován 30 min na ledu, promyt přidáním 1 ml PBS-BSA a vzorky centrifugovány 14000 \times g, 70 min, 4 °C. Pelet byl resuspendován v 350 μl PBS-BSA a vzorky změřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto II po dobu 2 min a nastavení napětí detektorů podle tabulky 4 (Napětí A). Společně se vzorkem byly pro kontrolu měření analyzovány samotný pufr bez přidaného vzorku a nebarvený vzorek. Analýza probíhala v programu FlowJo (10.7.1).

4.3.4.4 Gatovací strategie pro studii pacientů s MS

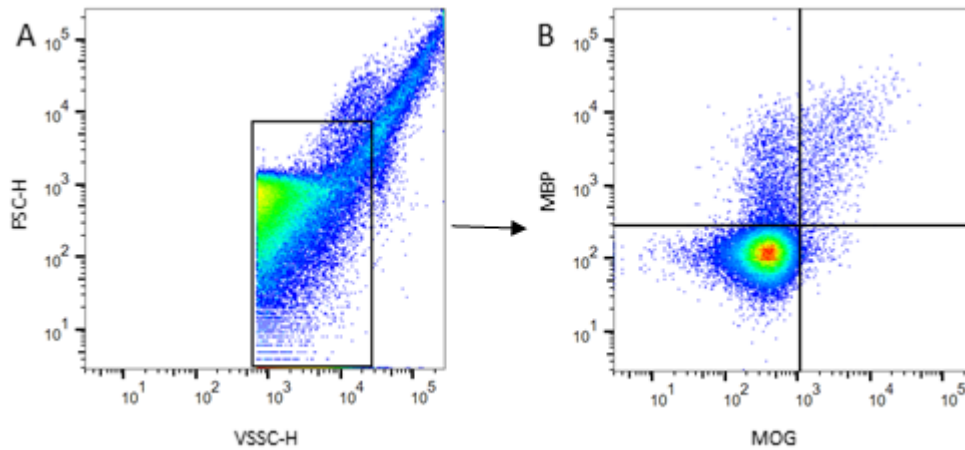
Pomocí změřených Apogee Mix Calibration beads byl vytvořen gate, který vylučuje kuličky o velikosti 1300 nm a zahrnuje 240nm, 300nm, 590nm a 800nm kuličky z oxidu křemičitého s RI 1,43 a 500nm polystyrenové kuličky s RI 1,59 (obrázek 2). Tento gate byl pojmenován jako EV gate a definoval měřené částice podle velikosti jako EV. Částice v EV gate byly dále analyzovány na základě fluorescence (obrázky 3-8).



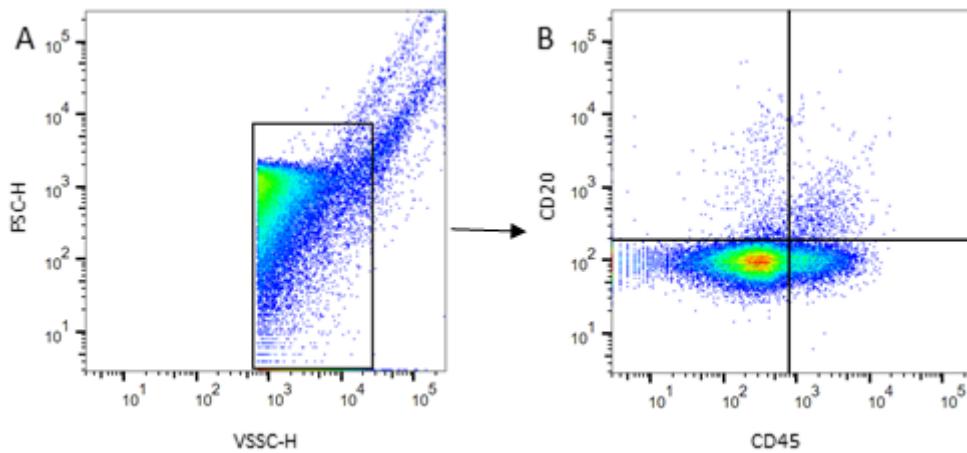
Obrázek 2: Vytvoření oblasti „EV gate“ podle Apogee Mix Calibration beads. EV gate obsahuje kuličky oxidu křemičitého velikosti A – 240 nm; B – 300 nm; C – 590 nm; D – 800 nm a polystyrenové kuličky: E – 500 nm. Křemičité kuličky F – 1300 nm leží mimo EV gate. EV gate byl definován jako oblast měřených částic menších než 1300nm kuličky z oxidu křemičitého a větší než limit detekce pomocí VSSC. RI pro kuličky z oxidu křemičitého je 1,43, pro polystyren 1,59.



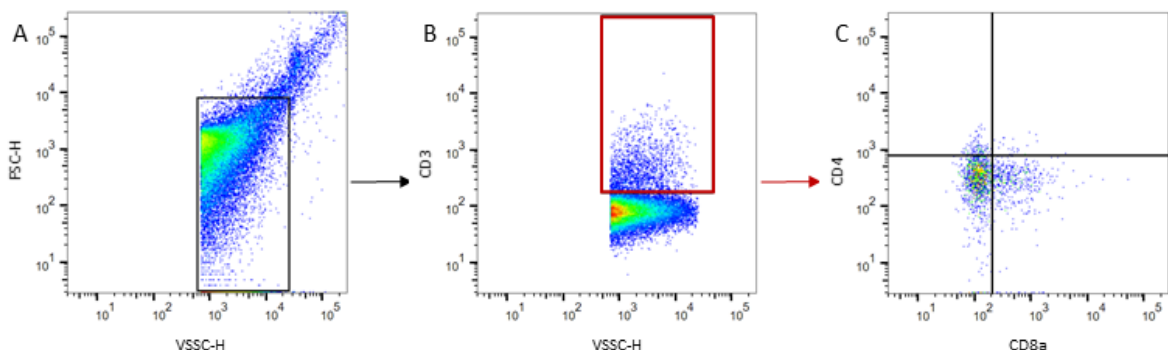
Obrázek 3: Gatovací strategie pro EV odvozené od endotelu; A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – Výběr CD45⁻ EV; C – EV značené pomocí protilátek proti CD31 a CD146, počítány byly události pozitivní na obě značky (pravý horní kvadrant); D – EV značené pomocí protilátek proti CD31 a CD105, počítány byly události pozitivní na obě značky; E – EV značené pomocí protilátek proti CD105 a CD146, počítány byly události pozitivní na obě značky; F – Události z oblasti CD105⁺CD146⁺ byly porovnány podle positivity na CD31 (výsledné trojitě pozitivní CD105⁺CD146⁺CD31⁺).



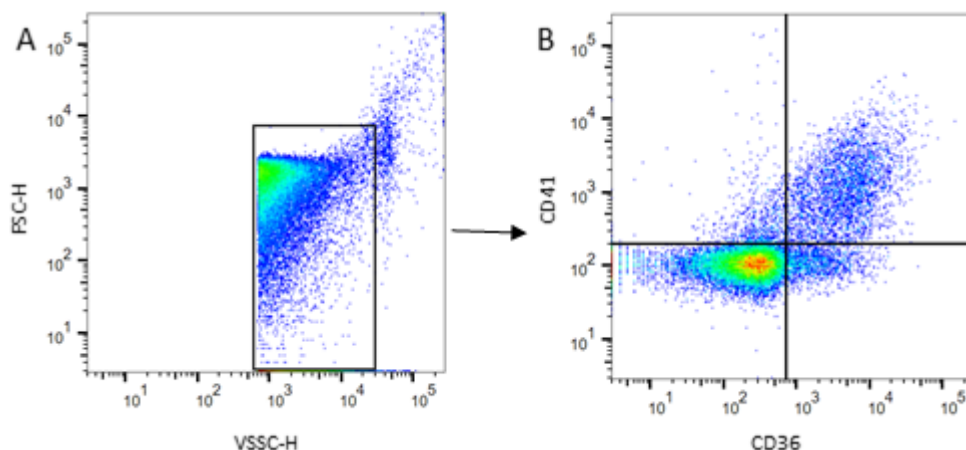
Obrázek 4: Gatovací strategie pro EV s myelinovými proteiny; A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – EV značené pomocí protilátek proti MOG a MBP, počítány byly události pozitivní na obě značky (pravý horní kvadrant).



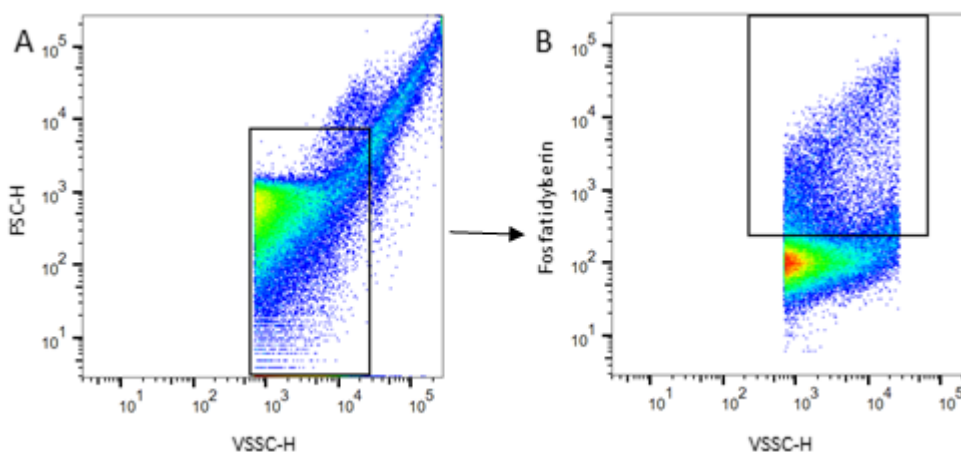
Obrázek 5: Gatovací strategie pro EV odvozené od B-lymfocytů; A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – EV značené pomocí protilátek proti CD45 a CD20, počítány byly události pozitivní na obě značky (pravý horní kvadrant).



Obrázek 6: Gatovací strategie pro EV odvozené od T-lymfocytů; A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – Výběr CD3⁺ EV, C – EV značené pomocí protilátek proti CD4 a CD8a.



Obrázek 7: Gatovací strategie pro EV odvozené od krevních destiček A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – EV značené pomocí protilátek proti CD36 a CD41, počítány byly události pozitivní pro obě značky (pravý horní kvadrant).



Obrázek 8: Gatovací strategie pro značení povrchového fosfatidylserinu pomocí Lactadherinu; A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – EV porovnané podle značení fosfatidylserinu pomocí Lactadherinu

4.3.4.5 Příprava a analýza vzorků předčasně narozených novorozenců

Vzorky byly rozmrazeny ve vodní lázni (37 °C, 5 min). Po rozmražení byl změřen objem a plasma byla centrifugována při 14000 × g, 70 min, 4 °C. Pelet byl resuspendován v 260 μl PBS-BSA a 30 μl vzorku bylo přidáno k 20 μl směsi generických barev a protilátek proti:

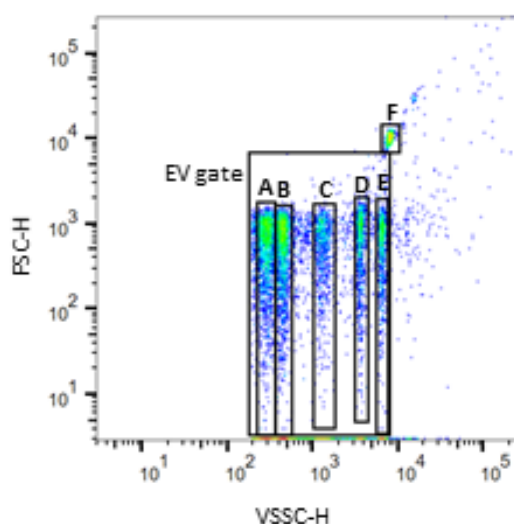
- Endotelovým proteinům – CD31 (AF488), CD105 (BV421), CD146 (PE-Cy7)
 - Jako negativní marker byla přidána protilátka proti CD45 (APC)
- Krevním destičkám – CD36 (APC), CD41 (BV421), CD62P (PE)

- Fosfatidylserinu a membráně – Lactadherin (FITC), CellMask™
- Placentárním proteinům – Syncytin-1 (CF647), PLAP (PE), CD105 (BV421)
- Negativní kontrola
- Isotypové kontroly

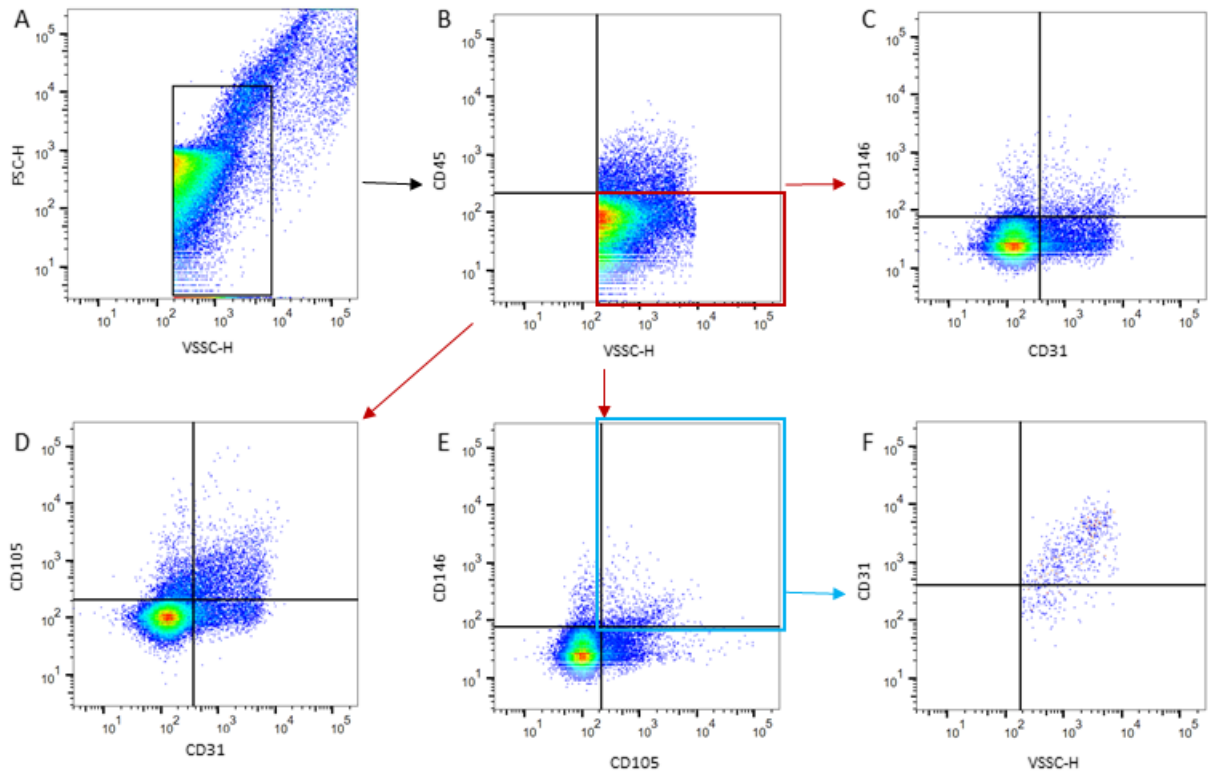
Vzorek s protilátkami byl inkubován 30 min na ledu ve tmě. Vzorky byly promyty pomocí 1 ml PBS-BSA a centrifugovány $14000 \times g$, 70 min, 4 °C. Pelety byly resuspendovány v 350 μ l PBS-BSA a vzorky změřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto II po dobu 2 min a nastavení napětí podle tabulky 4 (Napětí B). Společně se vzorkem byly pro kontrolu měření analyzovány samotný pufr neznačený vzorek. Analýza probíhala v programu FlowJo (10.7.1).

4.3.4.6 Gatovací strategie pro studii předčasně narozených novorozenců

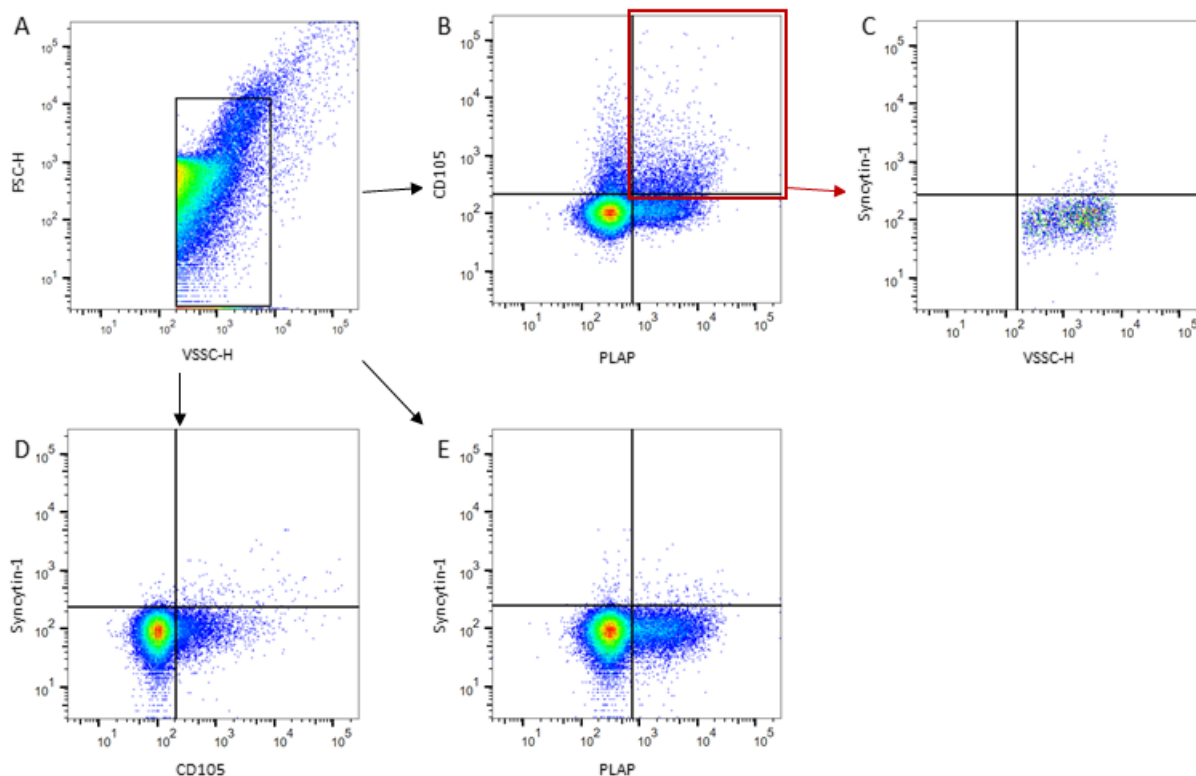
Stejně jako u analýzy vzorků pacientů s MS byl EV gate vytvořen podle naměřených Apogee Mix Calibration beads (obrázek 9). EV gate je oproti analýze EV u pacientů s MS posunutý z důvodu jiného nastavení cytometru. Vyhodnocení následně probíhalo podle použitých fluoroforů (obrázky 10-13).



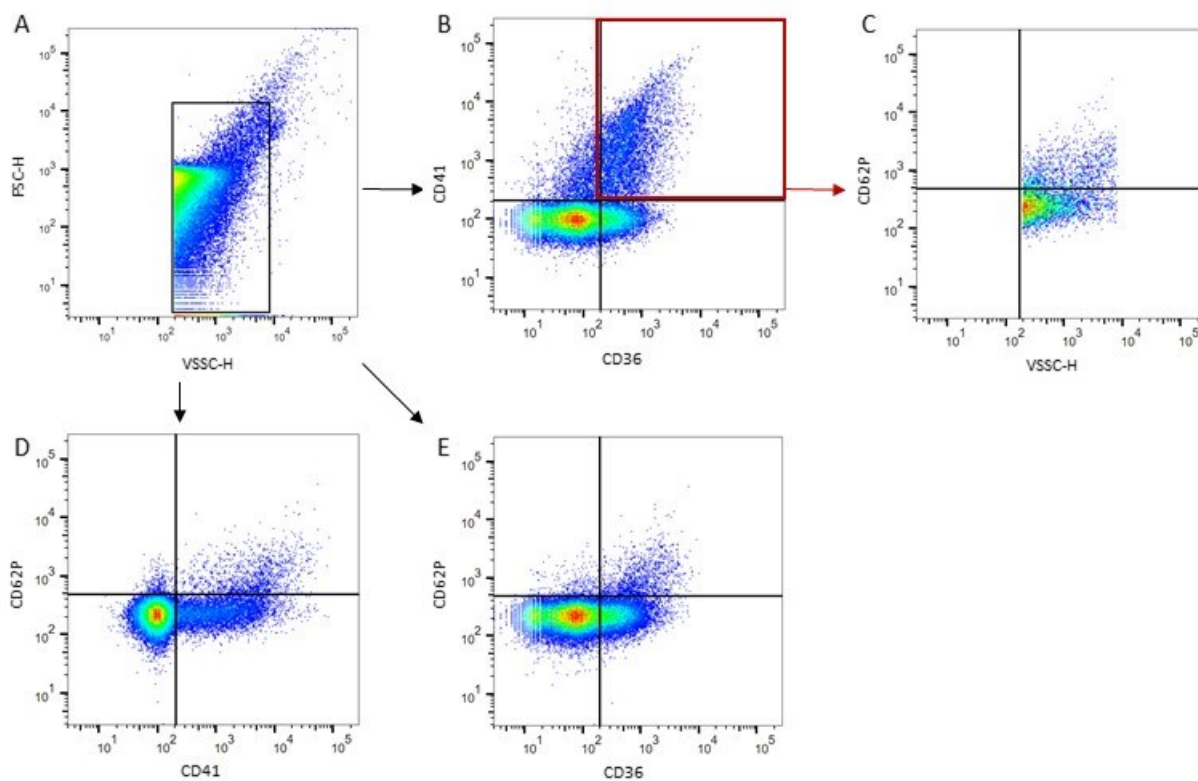
Obrázek 9: Vytvoření oblasti „EV gate“ podle Apogee Mix Calibration beads. EV gate obsahuje kuličky oxidu křemičitého velikosti A – 240 nm; B – 300 nm; C – 590 nm; D – 800 nm a polystyrenové kuličky: E – 500 nm. Křemičité kuličky F – 1300 nm leží mimo EV gate. EV gate byl definován jako oblast měřených částic menších než 1300nm kuličky z oxidu křemičitého a větší než limit detekce pomocí VSSC. RI pro kuličky z oxidu křemičitého je 1,43, pro polystyren 1,59.



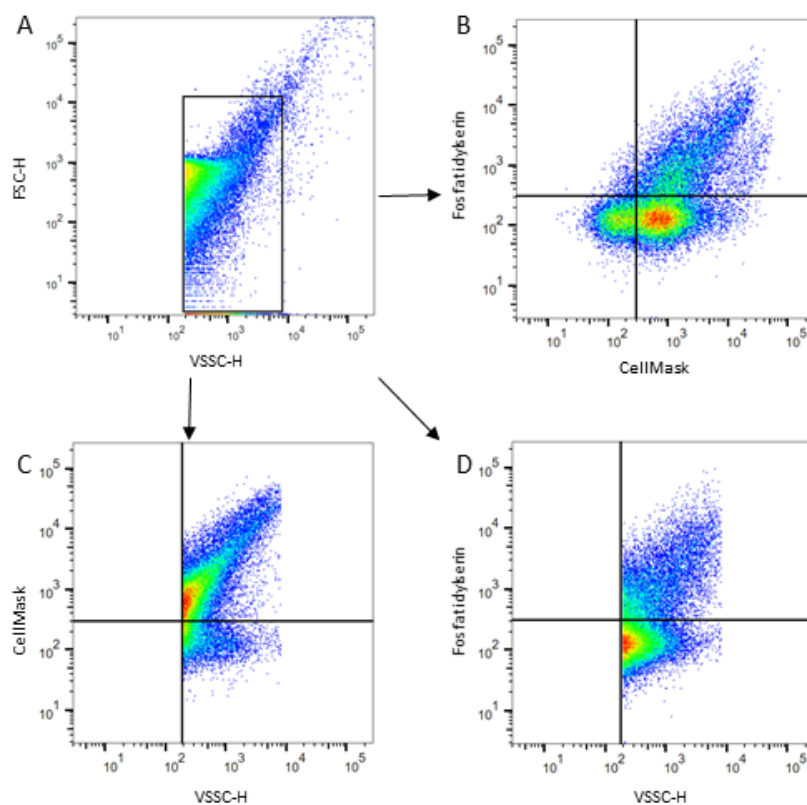
Obrázek 10: Gatovací strategie pro EV odvozené od endotelu; A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – Výběr CD45⁻ EV; C – EV značené pomocí protilátek proti CD31 a CD146, počítány byly události pozitivní na obě značky; D – EV značené pomocí protilátek proti CD31 a CD105, počítány byly události pozitivní na obě značky; E – EV značené pomocí protilátek proti CD105 a CD146, počítány byly události pozitivní na obě značky; F – Události z oblasti CD105⁺CD146⁺ byly porovnány podle pozitivity na CD31 (výsledné trojitě pozitivní CD105⁺CD146⁺CD31⁺).



Obrázek 11: Gatovací strategie pro EV odvozené od placenty; A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – EV značené pomocí protilátek proti CD105 a PLAP, počítány byly události pozitivní pro obě značky; C – události z oblasti CD105⁺PLAP⁺ porovnané podle positivity na Syncytin-1; D – EV značené pomocí protilátek proti CD105 a Syncytin-1, počítány byly události pozitivní na obě značky; E – EV značené pomocí protilátek proti PLAP a Syncytin-1, počítány byly události pozitivní na obě značky.



Obrázek 12: Gatovací strategie pro EV odvozené od krevních destiček A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – EV značené pomocí protilátek proti CD36 a CD41, počítány byly události pozitivní pro obě značky; C – události z oblasti $CD36^+CD41^+$ porovnané podle positivity na CD62P; D – EV značené pomocí protilátek proti CD41 a CD62P, počítány byly události pozitivní na obě značky; E – EV značené pomocí protilátek proti CD36 a CD62P, počítány byly události pozitivní na obě značky.



Obrázek 13: Gatovací strategie pro značení povrchového fosfatidylserinu pomocí Lactadherinu a membrán pomocí CellMask™. A – EV gate aplikovaný na patientský vzorek, B – EV značené pomocí Lactadherinu a CellMask™; C – EV porovnané podle pozitivního značení pomocí CellMask™; D – EV porovnané podle značení fosfatidylserinu pomocí Lactadherinu.

4.3.4.7 Kontrolní měření

Pro ověření signálu pozadí byly společně se vzorky měřeny kontroly samotného pufru a negativní kontrola neznačeného vzorku. K ověření případné falešné positivity výsledků byly měřeny také isotypové kontroly protilátek o stejné koncentraci jako odpovídající protilátky. K ověření interference barev a značení u analýzy předčasně narozených novorozenců byly změřeny také jednobarevné kontroly a kontroly celého panelu protilátek vždy bez jedné protilátky (FMO, *fluorescence minus one control*).

4.3.4.8 Kontrola specifity značení

Pro ověření specifity značení EV byla u vybraných vzorků před analýzou odebrána část vzorku, ke které byl přidán TX100 na výslednou koncentraci 0,1 %. Vzorek byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě a analyzován při stejném nastavení cytometru. Výsledky z měření byly porovnány s měřením bez detergentu.

4.3.4.9 Kontrola efektu roje

Pro ověření souběžné detekce více EV při měření byla část vzorků analyzována v sériovém ředění 1×, 2×, 4× a 8× za stejného nastavení cytometru.

4.3.4.10 Kalibrace dat z průtokového cytometru

Apogee Mix Calibration beads a SPHERO™ Ultra Rainbow Quantitative Particle Kit byly použity ke kalibraci dat z průtokového cytometru. Kalibrace byla provedena v softwaru FCM_{PASS} (verze 3.10) (Welsh *et al.*, 2020b).

Apogee Mix Calibration beads, které jsou vyrobené z oxidu křemičitého a polystyrenu, mají definovanou velikost a RI. Na jejich základě byla data kalibrována na velikost měřených událostí v nm.

SPHERO™ Ultra Rainbow Quantitative Particle Kit, které mají 6 populací s definovanou intenzitou fluorescence pro některé kanály. Na základě jejich změření na průtokovém cytometru při stejném nastavení jako při analýze vzorků a následnému porovnání s definovanou intenzitou fluorescence byly vyneseny křivky určující standartní jednotky fluorescence na námi používaném cytometru.

4.3.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace hemoglobinu ve vzorcích plasmy z pupečnickové krve

Supernatant z centrifugované plasmy (14000 × g, 4 °C, 70 min) byl vložen do kyvety a změřeno jeho absorpční spektrum na spektrofotometru Eppendorf při absorbanci 320-630 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda (MiliQ). Koncentrace hemoglobinu byla vypočítána podle vzorce:

$$c(\text{hemoglobin}) = 1,65A_{415} - 0,93A_{380} - 0,73A_{470} \text{ (Noe } et al., 1984).$$

Vzorek s koncentrací hemoglobinu vyšší než 0,2 g/l byl označený jako hemolytický (Hujacova *et al.*, 2021).

4.3.6 Western blot

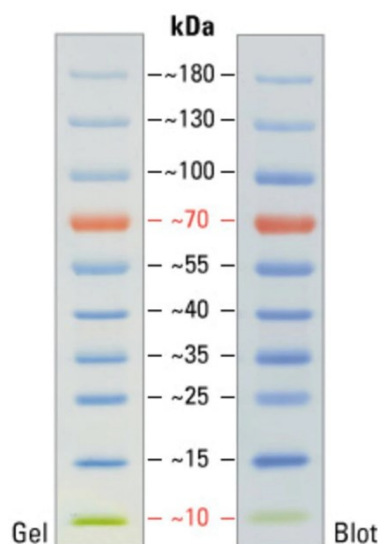
4.3.6.1 BCA Assay

Vzorky plasmy byly rozmrazeny (5 min, 37 °C) a EV dvakrát promyty PBS (14000 × g, 4 °C, 70 min) stejně jako při přípravě vzorků na cytometrii. Pelet byl rozpuštěn v 100 µl PBS a 25 µl vzorku bylo použito na BCA assay. Vzorek byl ředěn 2× v PBS

a lyzován pomocí lyzačního pufru 30 min na ledu. Lyzovaný vzorek byl centrifugován $14\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min a supernatant byl v duplikátu po 25 μl nanesen 96 jamkové destičky. Rovněž byla na destičku nanesená standardní řada ředění BSA o známé koncentraci. Do všech jamek bylo přidáno 200 μl reakčního činidla Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A a B (50:1 BCA reagent A:B) a destička byla inkubována 30 min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Spektrofotometrie v jamkách byla změřena na spektrofotometru Viktor³ a koncentrace proteinu byla vypočítána pomocí kalibrační křivky standardní koncentrace BSA.

4.3.6.2 Western Blot

Vzorek byl naředěný na požadovanou koncentraci proteinů. Ke vzorku byl přidán SB pufr a směs byla inkubována 5 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po 15 μl nanesen na 12% polyakrylamidový gel. Jako standard velikosti proteinů byl do jedné jamky nanesen PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ředěný 1:800 v SB. Příklad standardu velikosti je uvedený na obrázku 14. Vzorky na gelu byly rozděleny elektroforézou za konstantního napětí 105 V. Gely byly přeneseny na hydrofilizovanou $0,2\mu\text{m}$ PVDF membránu za konstantního proudu 200 mA, 150 min. Membrány byly 30 minut blokovány Azure blokačním pufrem a následně značeny primárními protilátkami proti CD41 a CD105 v Azure Fluorescence Blocking Buffer po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Následně byly jednu hodinu ve tmě fluorescenčně značeny sekundárními protilátkami s navázaným fluoroforem IR700 v Azure Fluorescence Blocking Buffer. Fluorescence byla změřena a vyfocena na Azure c600. Jako pozitivní kontroly pro protilátku proti CD105 byla použita buněčná linie HUVEC a pro protilátku proti CD41 krevní destičky. Denzitometrie byla vyhodnocena v programu AzureSpot (verze 2.0).



Obrázek 14: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, výrobce Thermo Scientific. Měřítko velikosti proteinů po proběhlé elektroforéze (Gel) a Westernblotu (Blot). Obrázek byl získaný ze stránek výrobce.

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26617?SID=srch-hj-26617>).

4.3.7 Elektronová mikroskopie

4.3.7.1 TEM pro studii MS

Vzorky plasmy z periferní krve byly centrifugovány dvakrát při $14000 \times g$, $4^\circ C$, 70 min. Pelet byl resuspendován v $100 \mu l$ PBS. Vzorek byl přenesen po $15 \mu l$ kapkách na parafilm. Na kapky byly položeny sítky pro transmisní elektronovou mikroskopii a inkubovány 20 min. Sítky byly přeneseny na $50 \mu l$ kapku 4% PFA v PBS a fixovány 20 min, poté byly fixovány na $50 \mu l$ kapkách 1% glutaraldehydu 5 min. Následně byly sítky promyty $8\times$ na dvě minuty na $100 \mu l$ kapce destilované deionizované vody (MiliQ). Vzorky byly kontrastovány na $20 \mu l$ kapce 4% uranyl oxolátu 5 min a embedovány na $25 \mu l$ kapce směsi uranyl acetátu s 2% methyl celulózou (1:9) na ledu 10 minut. Vrstva methyl celulózy a uranyl acetátu byla pomalu odstraněna pomocí filtračního papíru. Sítky byly přeneseny na filtrační papír a nechány ve tmě uschnout do druhého dne. Snímky byly pořízeny na TEM JEM 1011, CCD kamera, Veleta (Laboratoř elektronové mikroskopie, PřF UK).

4.3.7.2 TEM pro studii předčasně narozených novorozenců

Vzorky plasmy z pupečnickové krve byly centrifugovány $14000 \times g$, $4^\circ C$, 70 min. Pelet byl resuspendován v $100 \mu l$ PBS. Sítky pro transmisní elektronovou mikroskopii byly po 4 nalepeny na pryskyřicovou výplň ultracentrifugačních zkumavek. Do zkumavek byl na sítky nanesen vzorek a doplněn PBS. EV ve vzorku byly na sítku sedimentovány

centrifugací na ultracentrifuze $14000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 80 min, rotor SW 40 Ti. Po centrifugaci byly síťky odlepeny z pryskyřicové výplně a fixovány na kapce $50\ \mu\text{l}$ 4% PFA v PBS 20 min. Poté byly síťky procesovány stejně jako při přípravě vzorků elektronové mikroskopie pro studii MS (4.3.7.1).

4.3.8 Statistická analýza

Statistická analýza vzorků probíhala v programu GraphPad Prism (5.03 a 8.0.1). K testu normality byl použit test D'Agostino and Pearson omnibus normality test a Shapiro-Wilk normality test. Nenormálově rozložené skupiny byly porovnány jednofaktorovou analýzou rozptylu, konkrétně Kruskal-Wallis testem. Jednotlivé skupiny mezi sebou pak navíc Dunnovým testem. Porovnání tritonovaných vzorků bylo vyhodnoceno Wilcoxonovým párovým testem. Pro test korelace byl použit Spearmanův korelační test s výsledným Spearmanovým korelačním koeficientem (S_r). Jako signifikantní byly hodnoceny skupiny s $p < 0,05$. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

5 Výsledky

5.1 Analýza EV u pacientů s MS

5.1.1 Charakteristika skupin

Charakteristika skupin dle známých parametrů pacientů je zobrazena v tabulce 5.

Skupina	ND	ZL	N	NP	DK
Celkový počet pacientů	33	22	14	36	25
Počet žen, n (%)	26 (79)	18 (82)	11 (79)	25 (69)	19 (76)
Věk, průměr ± CI 95 %	40,3 ± 3,4	44,8 ± 4,4	42,3 ± 5,5	46,4 ± 4,2	43,2 ± 3,7
aktivní zánět CNS, n	1	0	0	7	0

Tabulka 5: Charakteristika skupin pacientů pro studii EV v periferní krvi pacientů s MS. Zkratky: ND – nově diagnostikovaní MS pacienti, ZL – pacienti se změnou léčby, N – pacienti léčení Natalizumabem, NP – pacienti s jinými neurologickými potížemi a vyloučenou MS, DK – zdraví dárce krve, CI (interval spolehlivosti, *confidence interval*)

5.1.2 Průtoková cytometrie

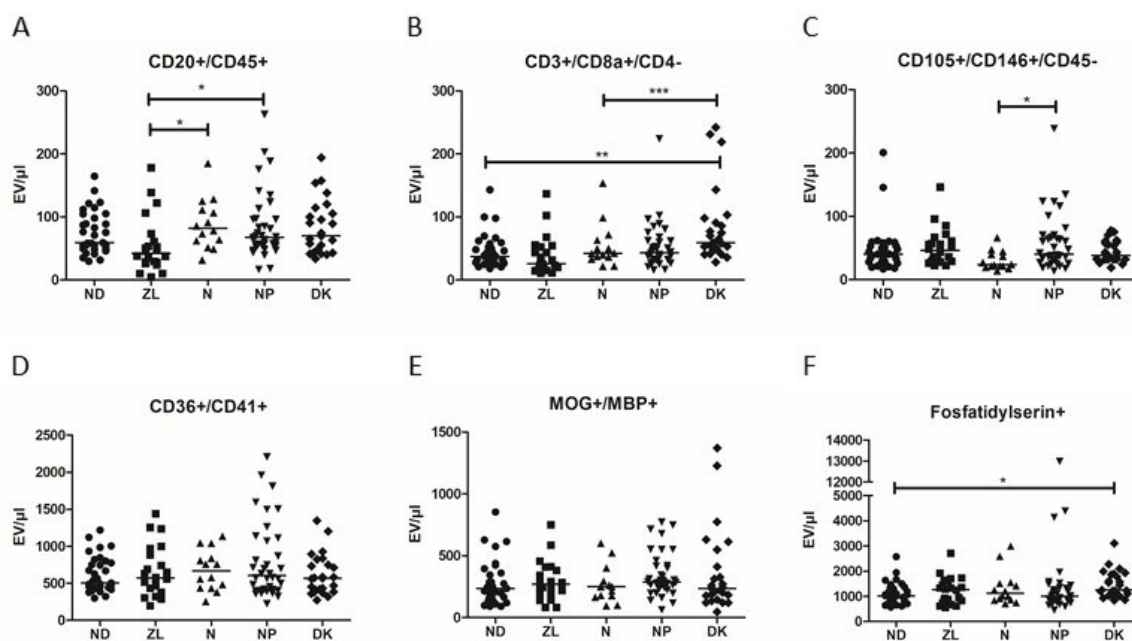
5.1.2.1 Rychlost průtoku cytometru

Pro správný výpočet množství EV v μl plasmy jsme vypočítali skutečnou rychlost průtoku cytometru pomocí Fluoresbrite® YG Microspheres, Calibration Grade 6.00 μm . Na Bürkerově komůrce bylo vypočítáno průměrné množství $2,42 \times 10^6$ kalibračních kuliček na mililitr. Analýza probíhala při nastavení „Low flow rate“, která dle výrobce odpovídá rychlosti 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Průměr měření kuliček byl 43802 kuliček/2 minuty. Průměrná rychlost průtoku vypočítaná z 12 kontrolních měření byla 9,05 μl za minutu.

5.1.2.2 Analýza vzorků

Analýza EV z periferní krve pacientů s MS a kontrol ukázala signifikantně nižší počty B-lymfocytárních $\text{CD}20^+\text{CD}45^+$ EV u ZL oproti N (55 ± 20 vs. 89 ± 23 EV/ μl , $p < 0,05$) a oproti NP (85 ± 18 EV/ μl , $p < 0,05$). V populaci T-lymfocytárních $\text{CD}3^+\text{CD}8^+\text{CD}4^-$ byly signifikantně snižené počty u skupiny ND oproti DK (45 ± 9 vs. 84 ± 25 EV/ μl , $p < 0,01$) a u ZL oproti DK (39 ± 14 vs. 84 ± 25 EV/ μl , $p < 0,001$). Počet endoteliálních $\text{CD}105^+\text{CD}146^+\text{CD}45^-$ EV byl signifikantně snížený u skupiny pacientů N

oproti NP (30 ± 8 vs. 58 ± 15 EV/ μ l, $p < 0,05$). Signifikantně snížené byly i počty Fosfatidylserin⁺ EV u ND oproti DK (1098 ± 152 vs. 1483 ± 221 EV/ μ l, $p < 0,05$). U ostatních populací pozitivních EV nebyly pozorovány signifikantní rozdíly mezi analyzovanými skupinami. Rozptyl hodnot naměřených počtů EV v jednotlivých skupinách je ukázán v grafech na obrázku 15. Počty EV v analyzovaných populacích jsou shrnuty v tabulce 6.



Obrázek 15: Počty EV na μ l plasmy z periferní krve pacientů s MS a kontrol. A – B-lymfocytární EV CD20⁺CD45⁺; B – T-lymfocytární EV CD3⁺CD8a⁺CD4⁻; C – Endoteliální EV CD105⁺CD146⁺CD45⁻; D – Destičkové EV CD36⁺CD41⁺; E – EV s myelinovými proteiny MOG⁺MBP⁺; F – EV s povrchovým fosfatidylserinem. Zkratky: ND – nově diagnostikovaní MS pacienti; ZL – MS pacienti se změnou léčby; N – MS pacienti léčení Natalizumabem; NP – pacienti s jinými neurologickými problémy a vyloučenou MS; DK – zdraví dárči krve; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Výsledky získané ve spolupráci s Mgr. Marií Kostelanskou, Ph.D. a Mgr. Jakubem Soukupem.

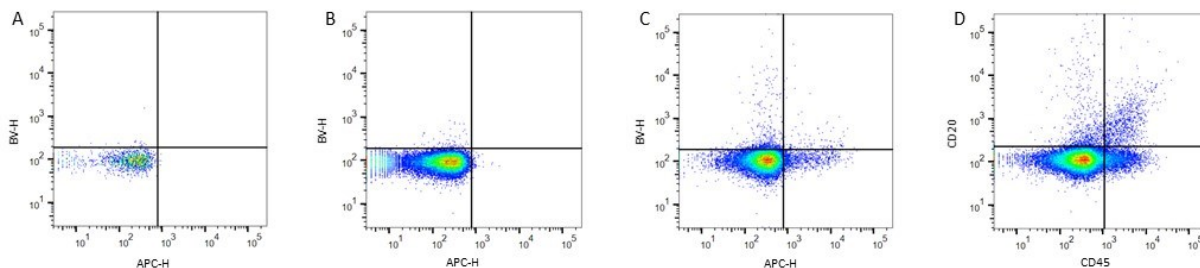
	ND	ZL	N	NP	DK	Signifikance
B-lymfocytární CD20 ⁺ CD45 ⁺ EV, průměr EV/μl ± CI 95 %	75 ± 12	55 ± 20	89 ± 23	85 ± 23	83 ± 18	ZL vs. N a ZL vs. NP (p<0,05)
T-lymfocytární CD3 ⁺ CD8a ⁺ CD4 ⁻ EV, průměr EV/μl ± CI 95 %	45 ± 9	39 ± 14	54 ± 20	53 ± 13	84 ± 25	ND vs. DK (p<0,01); ZL vs. DK (p<0,001)
Endoteliální CD105 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ⁻ EV, průměr EV/μl ± CI 95 %	47 ± 13	52 ± 13	30 ± 8	58 ± 15	44 ± 7	N vs. NP (p<0,05)
Destičkové CD41 ⁺ CD36 ⁺ EV, průměr EV/μl ± CI 95 %	617 ± 85	667 ± 149	677 ± 149	798 ± 173	614 ± 113	ns.
EV MBP ⁺ MOG ⁺ , průměr EV/μl ± CI 95 %	277 ± 64	295 ± 71	270 ± 85	345 ± 60	364 ± 139	ns.
Fosfatidylserin ⁺ EV, průměr EV/μl ± CI 95 %	1098 ± 152	1226 ± 236	1327 ± 393	1544 ± 718	1483 ± 221	ND vs. DK (p<0,05)

Tabulka 6: Průměrné počty naměřených EV na μl plasmy. Zkratky: CI – interval spolehlivosti (*confidence interval*), ns – nesignifikantní (*not significant*).

Výsledky získané ve spolupráci s Mgr. Marií Kostelanskou, Ph.D. a Mgr. Jakubem Soukupem.

5.1.2.3 Kontrolní experimenty cytometrie

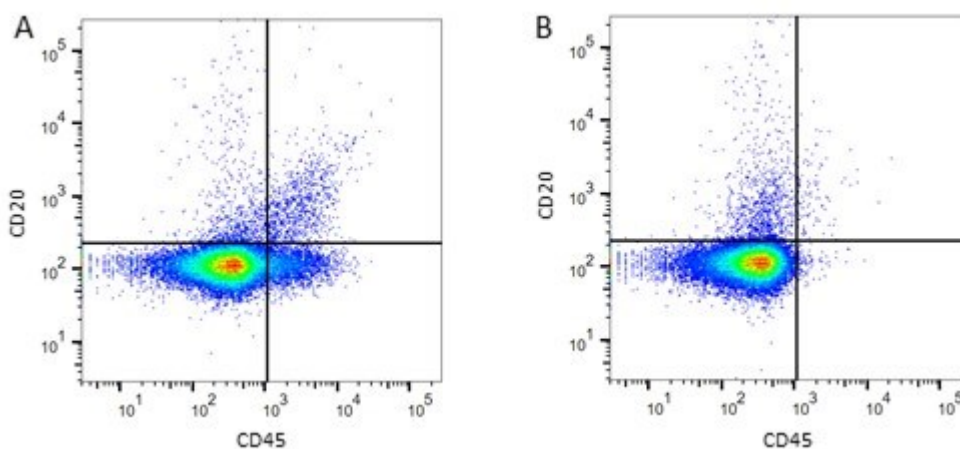
Pro studii EV v periferní krvi pacientů s MS byly společně se vzorky měřené následující kontroly: samotný pufr bez vzorku, isotypové kontroly a nebarvené kontroly. Samotný pufr neprodukoval žádný signál v gatech pro analyzované dvojité značené populace EV. Neznačený vzorek neposkytoval žádný signál v oblasti dvojité značených EV. Isotypové kontroly pravidelně produkovaly určitou hodnotu nespecifické fluorescence, avšak počet detekovaných částic v gatech pro dvojité značené EV byl nízký. Příklad zobrazení signálu použitých kontrol je ukázán na obrázku 16.



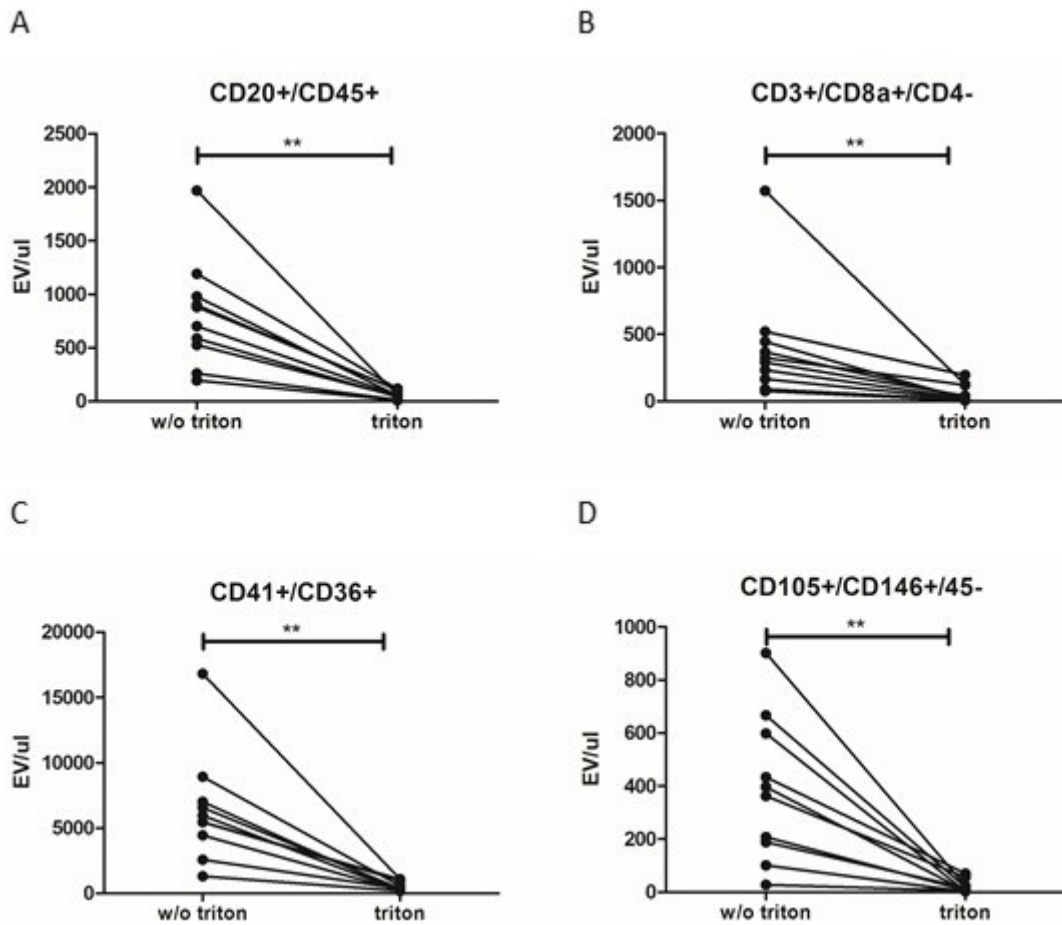
Obrázek 16: Příklady typického signálu kontrolních vzorků, Kontroly pro analýzu B-lymfocytárních EV. A – Samotný pufr; B – Negativní neznačená kontrola; C – Isotypová kontrola značená IgG1(APC) a IgG1(BV421); D – EV značené anti-CD45(APC) a anti-CD20(BV421). Jako B-lymfocytární EV byly do analýzy zahrnuty dvojitě značené částice v pravém horním kvadrantu.

5.1.2.4 Kontrola specifity značení EV

Přidání TX100 vedlo u všech kombinací protilátek k signifikantnímu snížení počtu dvojitě značených ($p < 0,01$). Příklad typické změny signálu vzorku po přidavku TX100 je zobrazený na obrázku 17. Grafy dokumentující signifikantní snížení počtu detekovaných EV po přidavku TX100 jsou na obrázku 18.

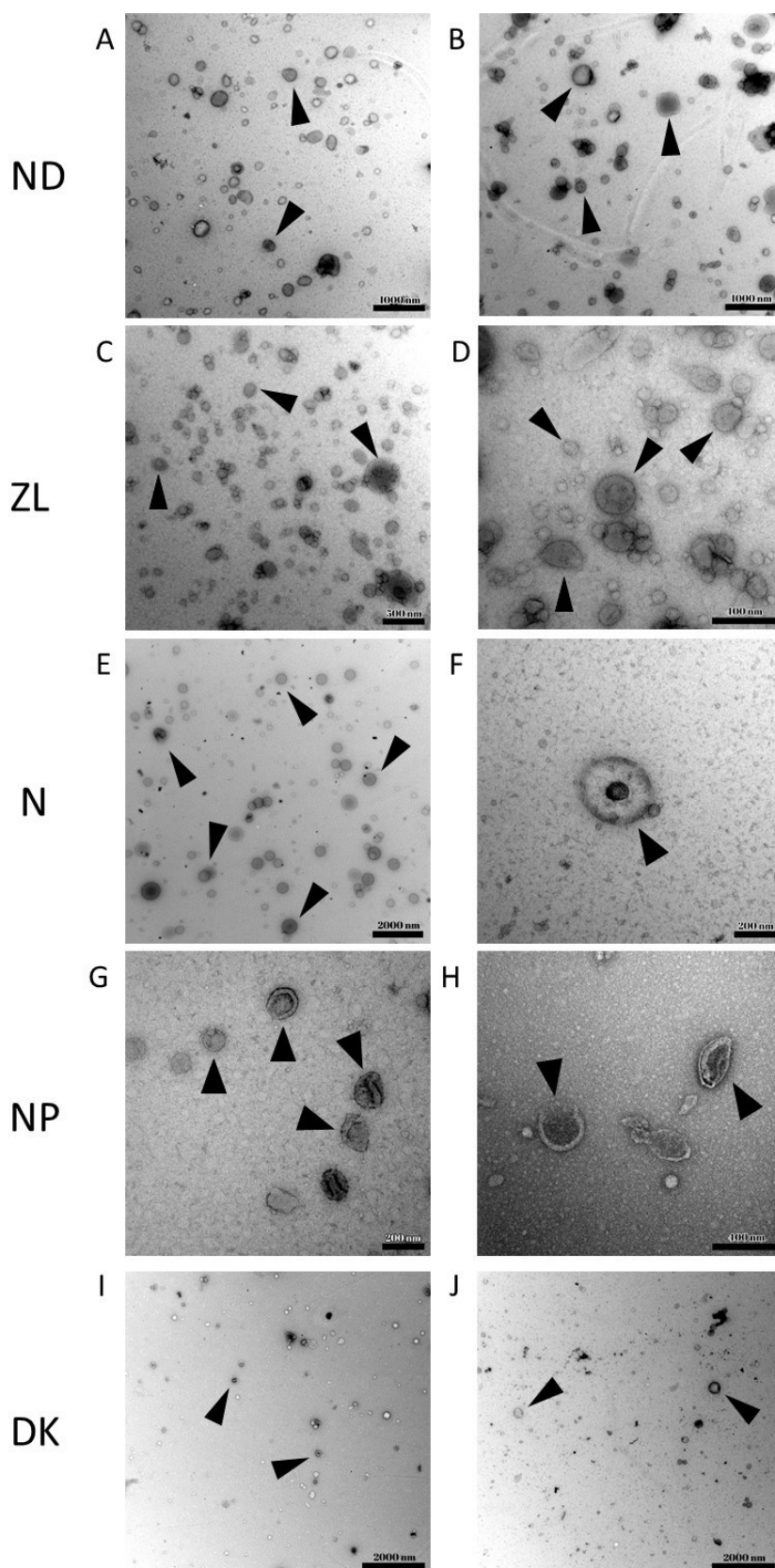


Obrázek 17: Kontrola specifity značení EV pomocí přidavku TX100. A – vzorek značený protilátkami anti-CD45(APC) a anti-CD20(BV421); B – tentýž vzorek 5 minut po přidání 0,1% TX100. Došlo k rozpuštění většiny částic v pravém horním kvadrantu.



Obrázek 18: Snížení počtu EV po přidavku TX100. EV. A – B-lymfocytární EV CD20⁺CD45⁺; B – T-lymfocytární EV CD3⁺CD8a⁺CD4⁻; C – Destičkové EV CD41⁺CD36⁺; D – Endoteliální EV CD105⁺CD146⁺CD45⁻. Ve všech analyzovaných populacích došlo po přidání TX100 k signifikantnímu snížení počtu EV. w/o triton (bez přidaného tritonu); triton (5 min po přidání 0,1% TX100). **p<0,01

5.1.3 Elektronová mikroskopie



Obrázek 19: Kontrola přítomnosti EV ve vzorcích pomocí elektronové mikroskopie. Vzorky byly připraveny stejným postupem jako vzorky na průtokovou cytometrii. A a B –

Pacientské vzorky ze skupiny ND, zvětšení 25000×, měřítko 1000 nm; C a D – Pacientské vzorky ze skupiny ZL, zvětšení: C 40000×, D 75000×, měřítko: C 500 nm, D 400 nm; E a F – Pacientské vzorky ze skupiny N, zvětšení: E 12000×, F 100000×, měřítko: E 2000 nm, F 200 nm; G a H – Pacientské vzorky ze skupiny NP, zvětšení: G 100000×, H 40000×, měřítko: G 200 nm, H 400 nm; I a J – Pacientské vzorky ze skupiny DK, zvětšení 15000×, měřítko 2000 nm; šipky označují vybrané EV;

Obrázky na TEM byly pořízeny Mgr. Jakubem Soukupem.

5.2 Analýza EV u předčasně narozených novorozenců

5.2.1 Charakteristika skupin

Charakteristika pacientů pro studii EV v pupečnickové krvi novorozenců je shrnuta v tabulce 7.

Skupina	PTIN	PT	C
Celkový počet pacientů	23	28	20
poměr Ž/M, n (%)	11/12 (48/52)	15/13 (54/46)	11/9 (55/45)
gestační věk (tt), průměr ± CI 95 %	29 ± 1	31 ± 1	38 ± 0,2
porodní hmotnost (g), průměr ± CI 95 %	1271 ± 152	1500 ± 172	3460 ± 167
porod CS (%)	74	100	100
c volného hemoglobinu v plasmě, průměr (g/l) ± CI 95 %	0,061 ± 0,013	0,056 ± 0,012	0,047 ± 0,009
c IL-6, průměr (mg/l) ± CI 95 %	112 ± 71	5 ± 1	5 ± 1
c CRP, průměr (mg/l) ± CI 95 %	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0	0,3 ± 0,01
c PCT, průměr (mg/l) ± CI 95 %	0,39 ± 0,21	0,2 ± 0,02	0,11 ± 0,01
úmrtí novorozence, n (%)	1 (4)	2 (7)	0 (0)
výskyt dvojčat n (%)	7 (30)	11 (39)	0 (0)
Placentární transfuze (bez/DCC/UCM), n (%)	7/10/6 (30/44/26)	9/14/5 (32/50/18)	20/0/0 (100/0/0)

Tabulka 7: Charakteristika pacientů ve studii EV předčasně narozených novorozenců. Zkratky: PTIN (předčasně narození novorozenci se zánětem), PT (předčasně narození novorozenci), C (donošení novorozenci), c (koncentrace, *concentration*), CS (císařský řez, *cesarean section*), CRP (C-reaktivní protein, *C-reactive protein*), PCT (prokalcitonin, *procalcitonin*), DCC (opožděné

svorkování pupeční šňůry, *delayed cord clamping*), UCM (dojení pupeční šňůry, *umbilical cord milking*), tt (týden těhotenství)

5.2.2 Spektrofotometrie hemolytických vzorků

Pro vyloučení hemolytických vzorků byla u všech spektrofotometricky změřena koncentrace volného hemoglobinu v bezdestičkové plasmě. V 80 vzorcích bylo zjištěno 9 se zvýšenou koncentrací volného hemoglobinu ($>0,2$ g/l plasmy), která ukazuje na přítomnost hemolýzy. Hemolytické vzorky byly ze statistické analýzy vyřazeny z důvodu signifikantně vyššího celkového počtu detekovaných částic v EV gate (10013 ± 2252 vs. $1,74 \times 10^6 \pm 0,46 \times 10^6$ EV/ μ l, $p < 0,0001$).

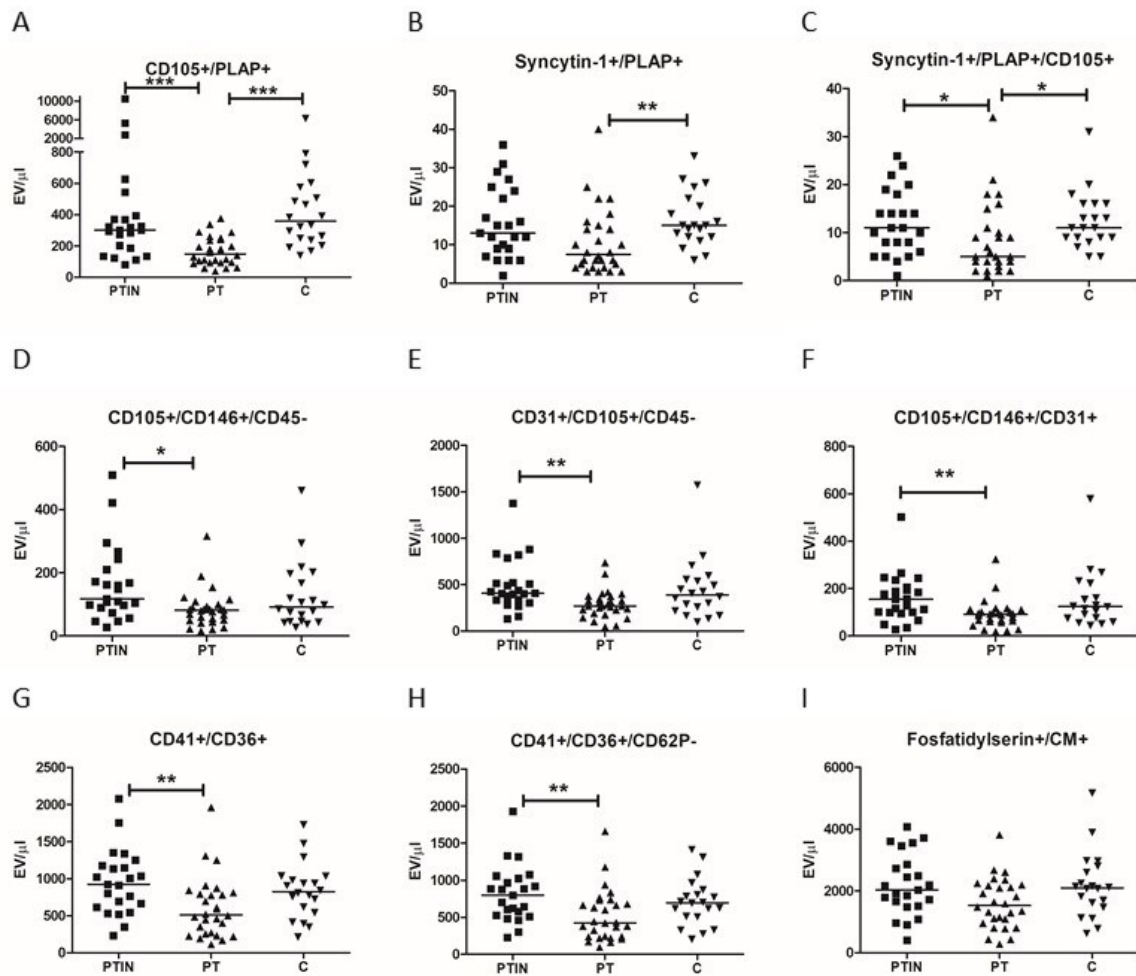
5.2.3 Průtoková cytometrie

5.2.3.1 Rychlost průtoku cytometru

Stejně jako při měření EV ve vzorcích pacientů s MS, byla změřena rychlost průtoku cytometru u měření vzorků plasmy z pupečnickové krve. Koncentrace kalibračních kuliček Fluoresbrite® YG Microspheres, Calibration Grade 6.00 μ m byla podle Bürkerovy počítací komůrky $3,3 \times 10^6$. Průměrný počet naměřených kuliček při 12 opakováních byl 54682 za 2 minuty měření. Rychlost po servisu cytometru poklesla na 8,29 μ l/min.

5.2.3.2 Analýza vzorků

Analýza EV v pupečnickové krvi u předčasně narozených a donošených novorozenců ukázala signifikantně zvýšené počty placentárních EV u CD105⁺PLAP⁺ EV ve skupině PTIN oproti PT (1057 ± 35 vs. 166 ± 35 EV/ μ l, $p < 0,001$). V placentární trojitě pozitivní populaci Syncytin-1⁺PLAP⁺CD105⁺ byl rovněž zvýšený počet EV ve skupině PTIN oproti PT (12 ± 3 vs. 8 ± 3 EV/ μ l, $p < 0,05$). Signifikantní rozdíly mezi skupinami byly ukázány i v endoteliálních a destičkových EV. Počty EV nebyly signifikantní mezi skupinami PTIN a C. Signifikantně snížené počty EV ve skupině PT oproti C byly u placentárních EV CD105⁺PLAP⁺ (166 ± 35 vs. 678 ± 619 EV/ μ l, $p < 0,001$) a Syncytin-1⁺PLAP⁺ (11 ± 4 vs. 17 ± 4 EV/ μ l, $p < 0,01$). V případě nespecificky značených membrán EV pomocí generické barvy CellMask a Lactadherinu vázící fosfatidylserin nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v počtech EV. Průměrné počty naměřených EV v jednotlivých analyzovaných skupinách a populacích jsou shrnuty v tabulce 8. Vybrané výsledky jsou uvedeny na obrázku 20.



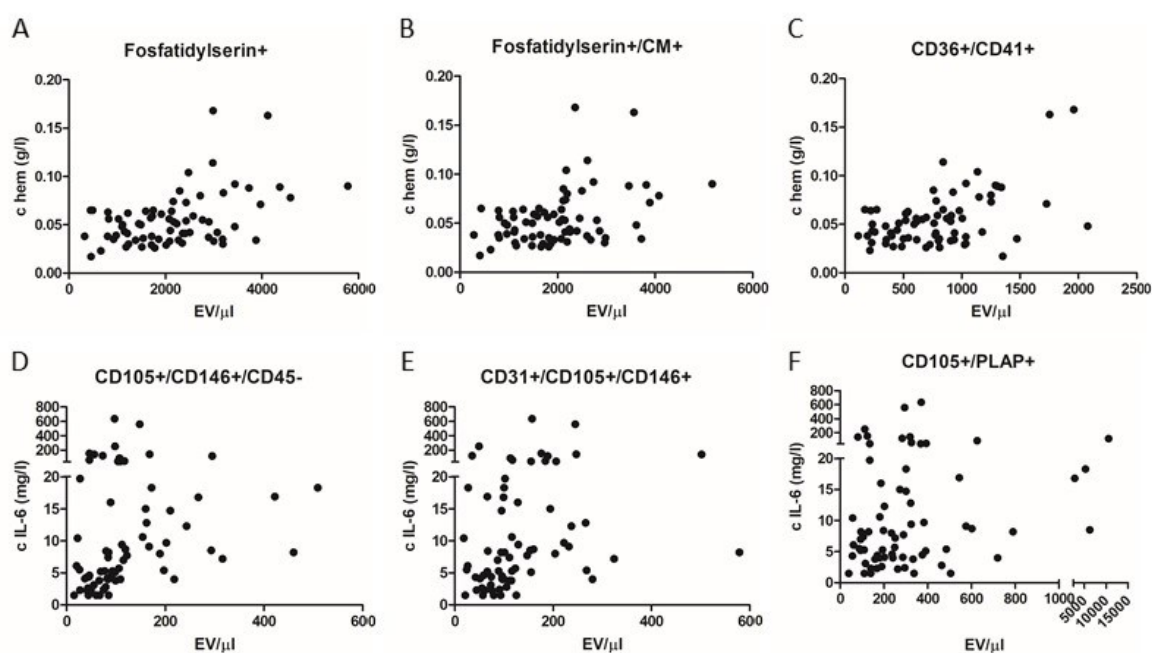
Obrázek 20: Grafy počtů EV na μl plasmy z pupečníkové krve předčasně narozených a donošených novorozenců. A – Placentární $\text{CD105}^+\text{PLAP}^+$ EV; B – Placentární $\text{Syncytin-1}^+\text{PLAP}^+$ EV; C – Placentární $\text{CD105}^+\text{Syncytin-1}^+\text{PLAP}^+$ EV; D – Endoteliální $\text{CD105}^+\text{CD146}^+\text{CD45}^-$ EV; E – Endoteliální EV $\text{CD31}^+\text{CD105}^+\text{CD45}^-$; F – Endoteliální EV $\text{CD105}^+\text{CD146}^+\text{CD31}^+$; G – Destičkové $\text{CD36}^+\text{CD41}^+$ EV; H – Destičkové $\text{CD36}^+\text{CD41}^+\text{CD62P}^+$ EV; I – Fosfatidylserin⁺CellMaskTM EV. Zkratky: CM – CellMaskTM PTIN – předčasně narození novorozenci se zánětem; PT – předčasně narození novorozenci bez zánětu; C – donošení novorozenci; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

	PTIN	PT	C	Signifikance
Placentární Syncytin-1 ⁺ PLAP ⁺ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	16 \pm 4	11 \pm 4	17 \pm 4	PT vs. C (p<0,01)
Placentární Syncytin-1 ⁺ CD105 ⁺ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	27 \pm 8	17 \pm 5	28 \pm 14	PTIN vs. PT (p<0,05)
Placentární PLAP ⁺ CD105 ⁺ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	1057 \pm 1023	166 \pm 35	678 \pm 619	PTIN vs. PT a PT vs. C (p<0,001)
Placentární Syncytin-1 ⁺ PLAP ⁺ CD105 ⁺ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	12 \pm 3	8 \pm 3	13 \pm 3	PTIN vs. PT a PT vs. C (p<0,05)
Endoteliální CD105 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ⁻ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	162 \pm 52	85 \pm 23	126 \pm 50	PTIN vs. PT (p<0,05)
Endoteliální CD31 ⁺ CD105 ⁺ CD45 ⁻ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	496 \pm 121	290 \pm 58	446 \pm 293	PTIN vs. PT (p<0,01)
Endoteliální CD31 ⁺ CD105 ⁺ CD146 ⁺ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	160 \pm 44	92 \pm 23	155 \pm 57	PTIN vs. PT (p<0,01)
Endoteliální CD31 ⁺ CD146 ⁺ CD45 ⁻ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	131 \pm 44	80 \pm 23	123 \pm 48	ns
Destičkové CD36 ⁺ CD41 ⁺ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	950 \pm 189	609 \pm 159	838 \pm 176	PTIN vs. PT (p<0,01)
Destičkové CD36 ⁺ CD41 ⁺ CD62P ⁻ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	814 \pm 164	522 \pm 136	706 \pm 150	PTIN vs. PT (p<0,01)
Destičkové CD36 ⁺ CD41 ⁺ CD62P ⁺ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	136 \pm 50	87 \pm 34	132 \pm 37	ns
Fosfatidylserin ⁺ CM ⁺ EV, průměr EV/ μ l \pm CI 95 %	2205 \pm 429	1605 \pm 315	2176 \pm 499	ns

Tabulka 8: Průměrný počet EV na μ l plasmy z pupečnickové krve novorozenců. Zkratky: CM – CellMask™; PTIN – předčasně narození novorozenci se zánětem; PT – předčasně narození novorozenci se zánětem; C – donošení novorozenci; CI – interval spolehlivosti (*confidence interval*); ns – nesignifikantní (*not significant*).

5.2.3.3 Korelace počtu EV s klinickými faktory

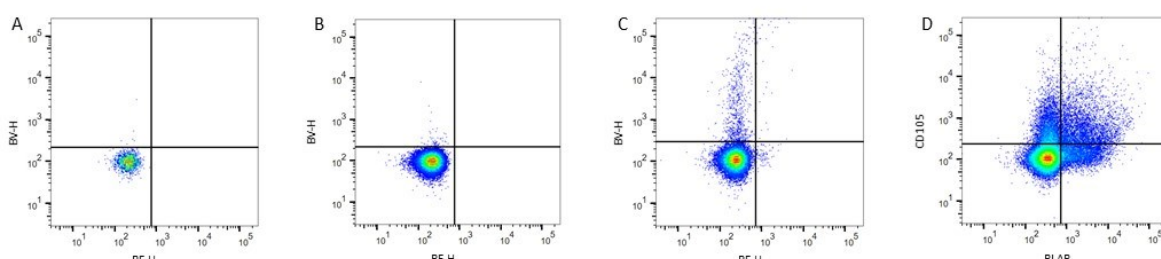
Počty EV všech patientských vzorků byly korelovány s následujícími klinickými faktory: gestační věk, porodní hmotnost, koncentrace volného hemoglobinu, IL-6, CRP, PCT nebo tělesná teplota novorozence. Signifikantní korelace byla nalezena mezi koncentrací volného hemoglobinu ve vzorku a počtem Fosfatidylserin⁺ EV ($S_r = 0,37$, $p = 0,0016$), Fosfatidylserin⁺CellMaskTM⁺ EV ($S_r = 0,31$, $p = 0,008$), a destičkových CD36⁺CD41⁺ EV ($S_r = 0,34$, $p = 0,0021$). K signifikantní korelaci došlo i mezi koncentrací IL-6 a počtem endotelových CD105⁺CD146⁺CD45⁻ EV ($S_r = 0,38$, $p = 0,007$), a CD31⁺CD105⁺CD146⁺ EV ($S_r = 0,4$, $p = 0,0006$). V případě placentárních EV nevyšel žádný korelační test signifikantní. Porovnání EV populací s ostatními klinickými faktory rovněž neukázalo signifikantní korelaci. Výsledné grafy jsou zobrazeny na obrázku 21. Odlišnosti průběhu porodu (vaginální porod vs. císařský řez, placentární transfuse) neukázaly souvislosti s výsledky.



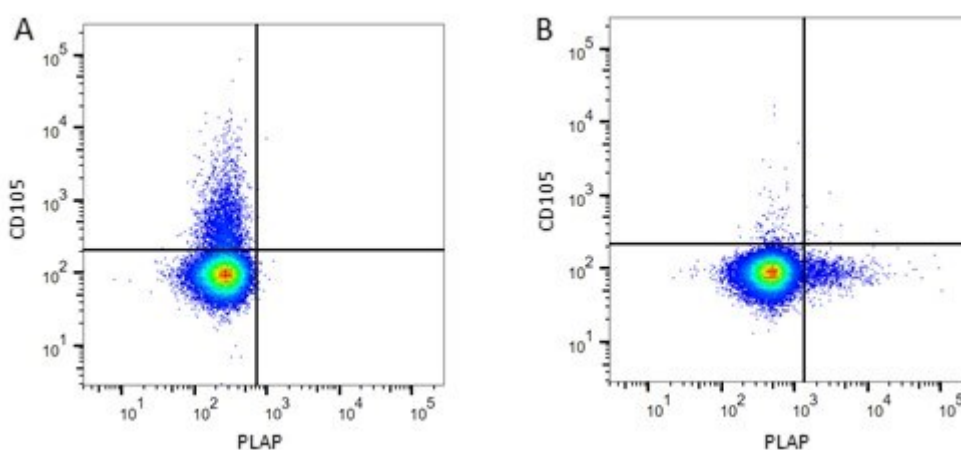
Obrázek 21: Korelace počtu EV s vybranými klinickými faktory. A – korelace počtu Fosfatidylserin⁺ EV a koncentrace volného hemoglobinu ve vzorku ($S_r = 0,37$, $p = 0,0016$); B – korelace Fosfatidylserin⁺CellMaskTM⁺ EV a koncentrace volného hemoglobinu ve vzorku ($S_r = 0,31$, $p = 0,008$); C – korelace počtu destičkových CD36⁺CD41⁺ EV a koncentrace volného hemoglobinu ve vzorku ($S_r = 0,34$, $p = 0,0021$); D – korelace počtu endoteliálních CD105⁺CD146⁺CD45⁻ EV a koncentrace IL-6 v krvi novorozence ($S_r = 0,38$, $p = 0,007$); E – korelace počtu endoteliálních CD31⁺CD105⁺CD146⁺ EV a koncentrace IL-6 v krvi novorozence ($S_r = 0,4$, $p = 0,0006$); F – korelace počtu placentárních CD105⁺PLAP⁺ EV a koncentrace IL-6 v krvi novorozence ($S_r = 0,2$, $p > 0,05$). Zkratky: CM – CellMaskTM

5.2.3.4 Kontrolní experimenty cytometrie

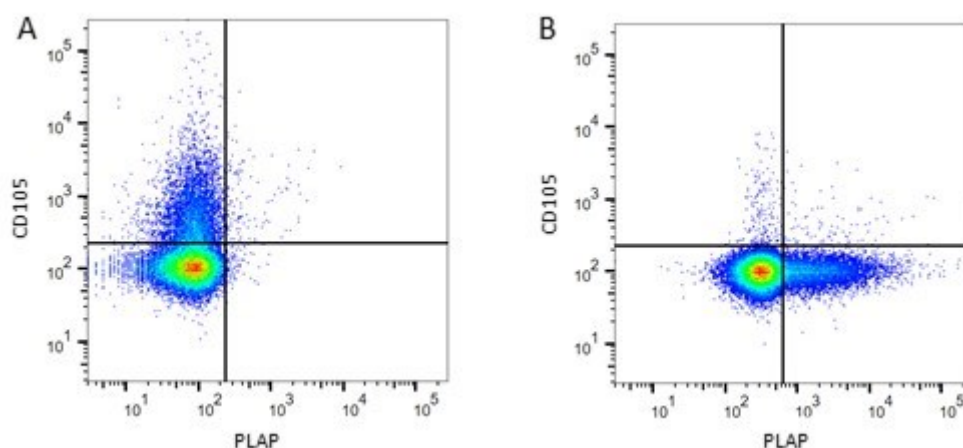
Stejně jako při analýze EV v periferní krvi pacientů s MS byly i při analýze EV v pupečnickové krvi novorozenců společně se vzorky měřeny kontroly, a to samotný pufr, neznačené negativní kontroly a isotypové kontroly. Měření pufru a negativních kontrol ukázalo, že ve dvojitě pozitivním gatu nebyl výskyt EV. V isotypových kontrolách byl výskyt částic ve dvojitě pozitivním gatu minimální (obrázek 22). Oproti analýze EV u pacientů s MS byly v analýze EV v pupečnickové krvi novorozenců přidány také jednobarevné (obrázek 23) a FMO kontroly (obrázek 24), které ukazují slabou interferenci značení.



Obrázek 22: Základní kontroly při analýze EV z pupečnickové krve novorozenců. Příklady jsou zobrazeny při značení placentárních EV A – EV v pufru; B – EV v neznačené negativní kontrole; C – isotypová kontrola, ve kvadrantech pozitivních jen na jednu fluorescenci jsou oproti negativním kontrolám zvýšené počty EV. Ve dvojitě pozitivním kvadrantu je výskyt pozitivních částic ojedinělý; D – vlastní vzorek značený protilátkami proti Syncytin-1(CF647), PLAP(PE) a CD105(BV421). Zobrazené jsou parametry PLAP a CD105. Na vzorku je vidět vyšší zastoupení dvojitě pozitivních EV.



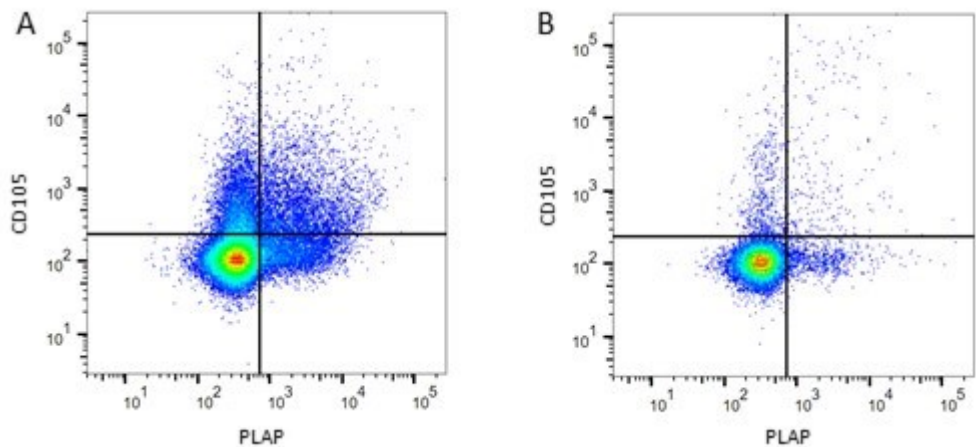
Obrázek 23: Jednobarevné kontroly pro panel placentárních markerů. A – vzorek značený pouze protilátkou proti CD105(BV421); B – vzorek značený pouze protilátkou proti PLAP(PE).



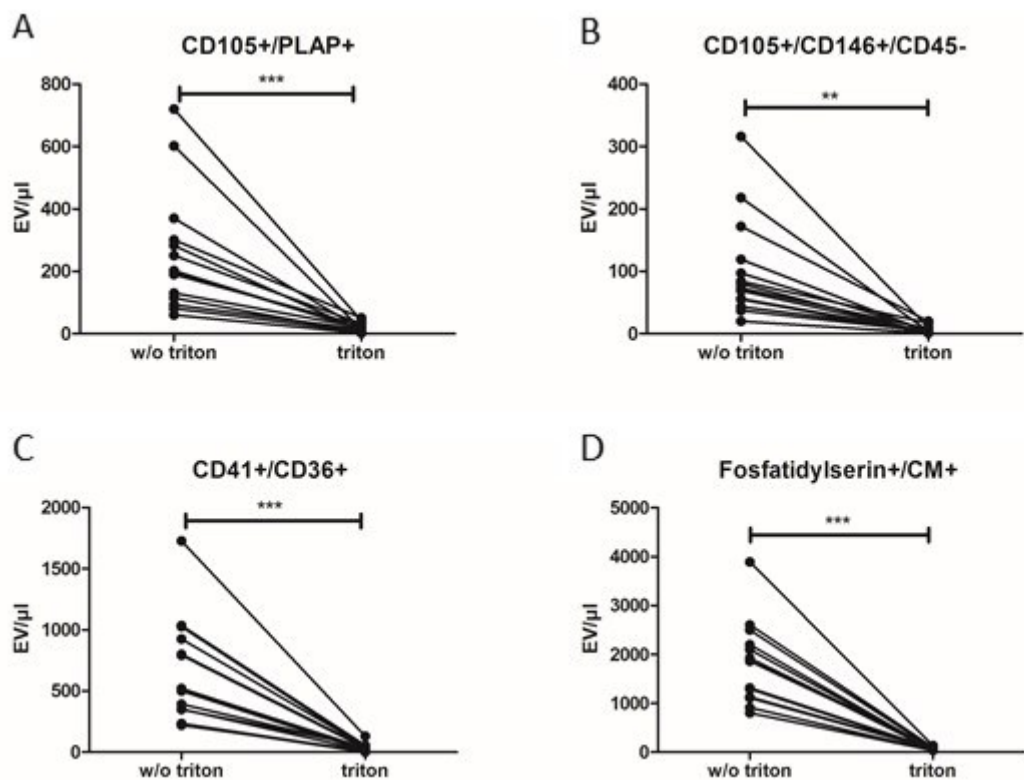
Obrázek 24: FMO kontroly pro panel placentárních markerů proti CD105(BV421), PLAP(PE) a Syncytin-1(CF647). A – placentární panel bez protilátky proti PLAP(PE); B – placentární panel bez protilátky proti CD105(BV421).

5.2.3.5 Kontrola specifity značení EV

Kontroly měření EV před a 5 minut po přidání 0,1% TX100 ukázaly signifikantní snížení dvojitě pozitivních EV po přidání TX100. V populaci placentárních CD105⁺PLAP⁺ EV byl počet ve vzorku 257 ± 113 EV/ μ l snížen přidáním 0,1% TX100 na 19 ± 8 EV/ μ l ($p < 0,001$). U endoteliálních CD105⁺CD146⁺CD45⁻ EV se přidavkem TX100 snížil počet EV z 103 ± 7 na 6 ± 3 EV/ μ l, ($p < 0,01$). U destičkových EV se po přidání 0,1% TX100 snížil počet CD41⁺CD36⁺ EV z 650 ± 247 na 37 ± 19 EV/ μ l, ($p < 0,001$). Signál EV značených Fosfatidylserin⁺CellMask^{TM+} se po přidání 0,1% TX100 snížil z 1825 ± 479 na 73 ± 17 EV/ μ l, ($p < 0,001$). Analýza tritonovaných vzorků je ukázána na obrázku 25, grafy jejich vyhodnocení ukazuje obrázek 26.



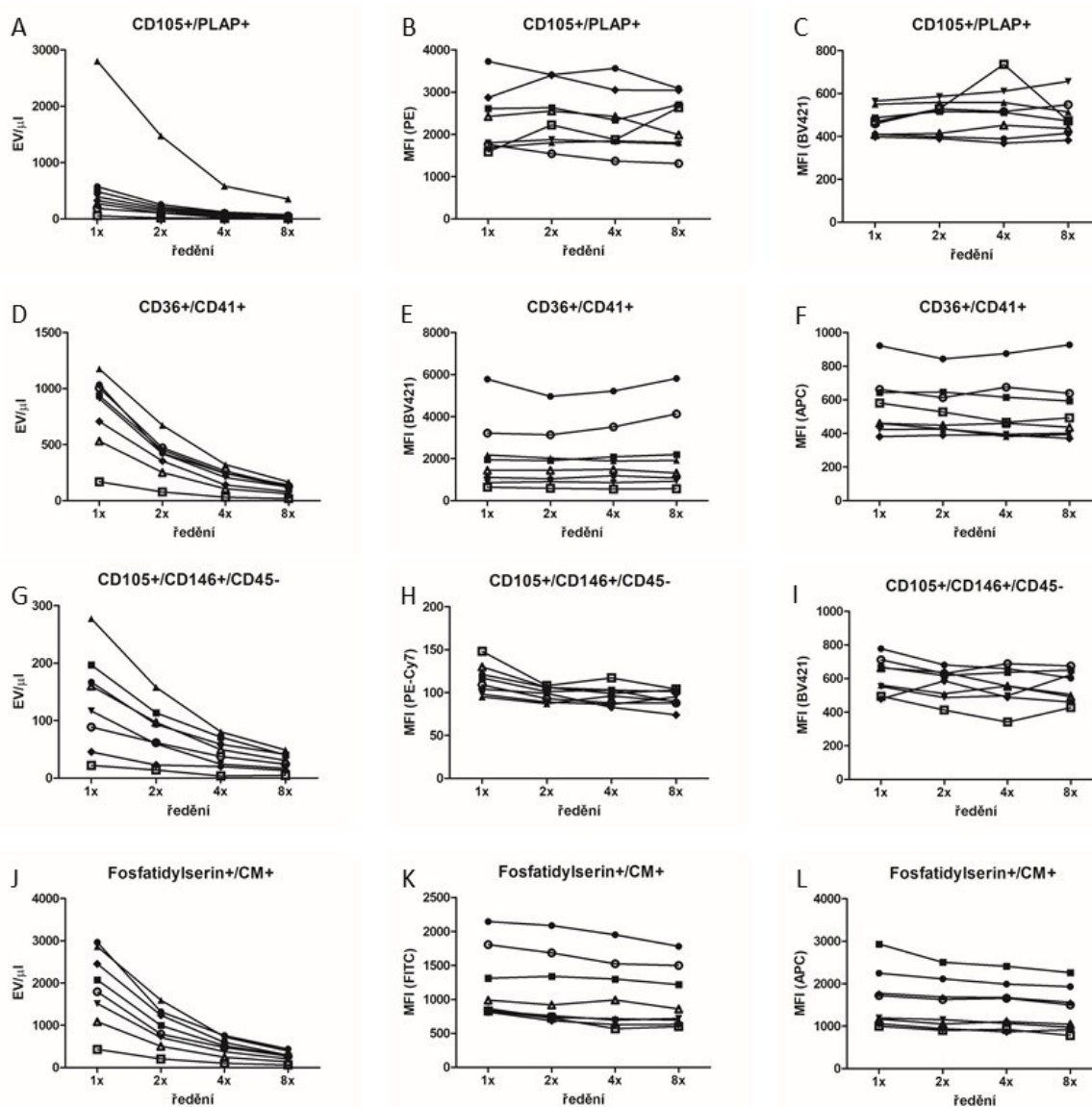
Obrázek 25: Kontrola specifity značení EV. Vzorek značený panelem placentárních markerů (A) a kontrola po přidání 0,1% TX100 (B). Vzorek změřený 5 minut po přidání 0,1% TX100 ukazuje snížení celkového počtu měřených částic i EV ve všech kvadrantech.



Obrázek 26: Snížení počtu EV po přidavku TX100. A – Placentární CD105⁺PLAP⁺ EV; B – Endoteliální CD105⁺CD146⁺CD45⁻ EV; C – Destičkové CD41⁺CD36⁺ EV; D – Fosfatidylserin⁺CellMaskTM EV. w/o triton (bez přidaného tritonu); triton (5 min po přidání 0,1% TX100). Zkratka: CM – CellMaskTM; **p<0,01; ***p<0,001;

5.2.3.6 Kontrola efektu roje

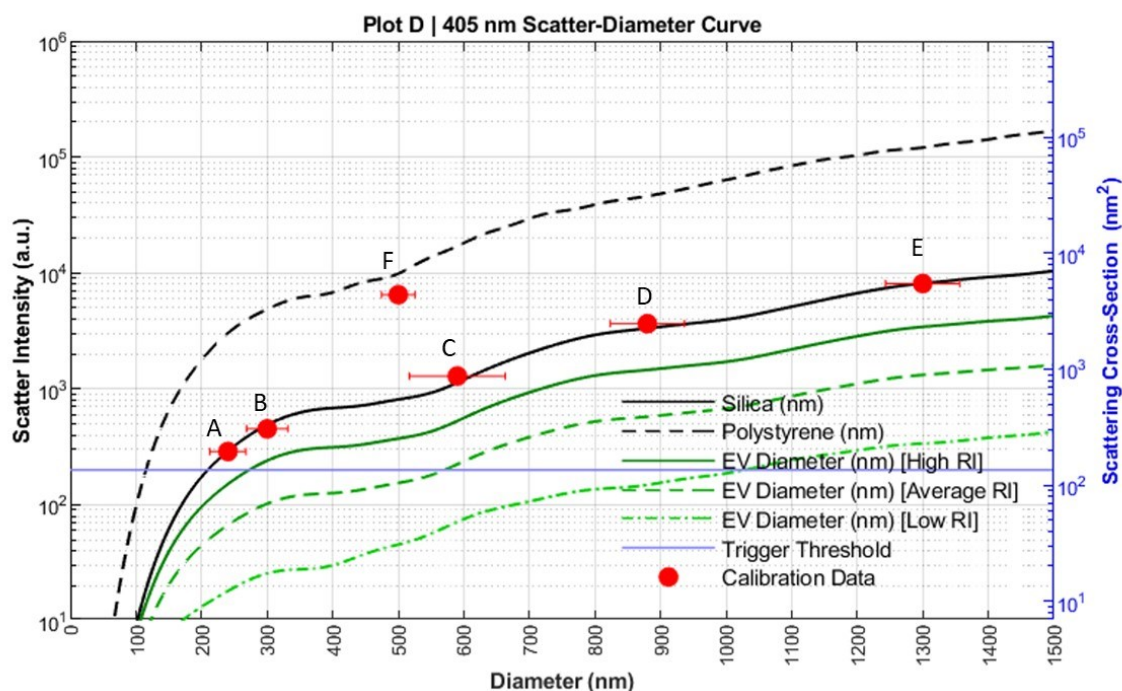
Kontrolní vzorky ($n = 8$) měřené ředěné postupně $1\times$, $2\times$, $4\times$ a $8\times$ ukazují snižování počtu EV/ μl . Medián intenzity fluorescence (MFI, *median fluorescence intensity*) se v průběhu ředění nesnižoval (obrázek 27).



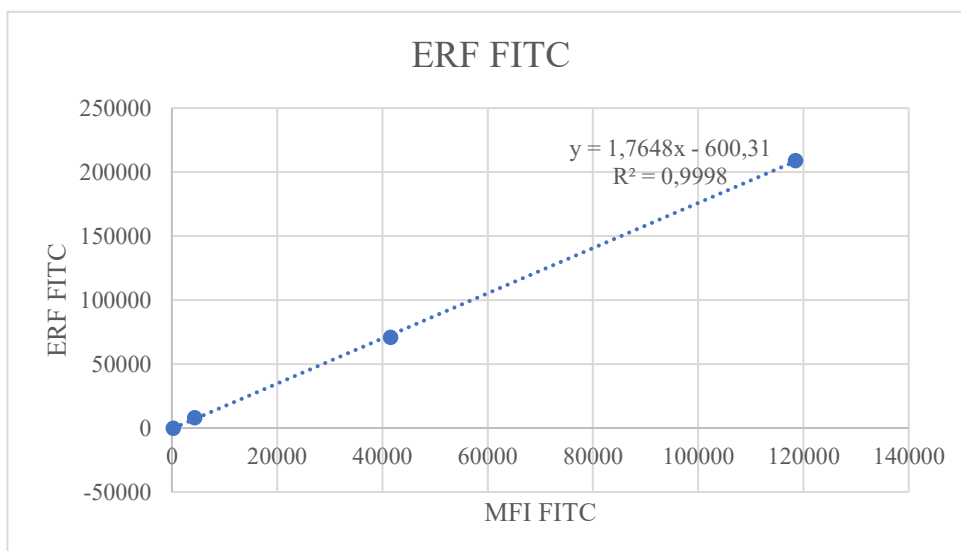
Obrázek 27: Kontrola souběžné detekce EV, efektu roje. První sloupec ukazuje klesající počty EV ve dvojitě pozitivním gatu při vyšším ředění, druhé dva sloupce pak MFI jednotlivých fluoroforů. Každý řádek pak představuje jiný panel protilátek. A – C – Placentární $\text{CD105}^+\text{PLAP}^+$ EV; (A – Počty EV/ μl ; B – MFI pro PE; C – MFI pro BV421); D – F – Destičkové $\text{CD36}^+\text{CD41}^+$ EV; (D – Počty EV/ μl ; E – MFI pro BV421; F – MFI pro APC); G – I – Endoteliální $\text{CD105}^+\text{CD146}^+\text{CD45}^-$ EV; (G – Počty EV/ μl ; H – MFI pro PE-Cy7; I – MFI pro BV421); J – L – Fosfatidylerin $^+$ CellMask $^{\text{TM}}$ EV; (J – Počty EV/ μl ; K – MFI pro FITC; L – MFI pro APC).

5.2.3.7 Kalibrace dat

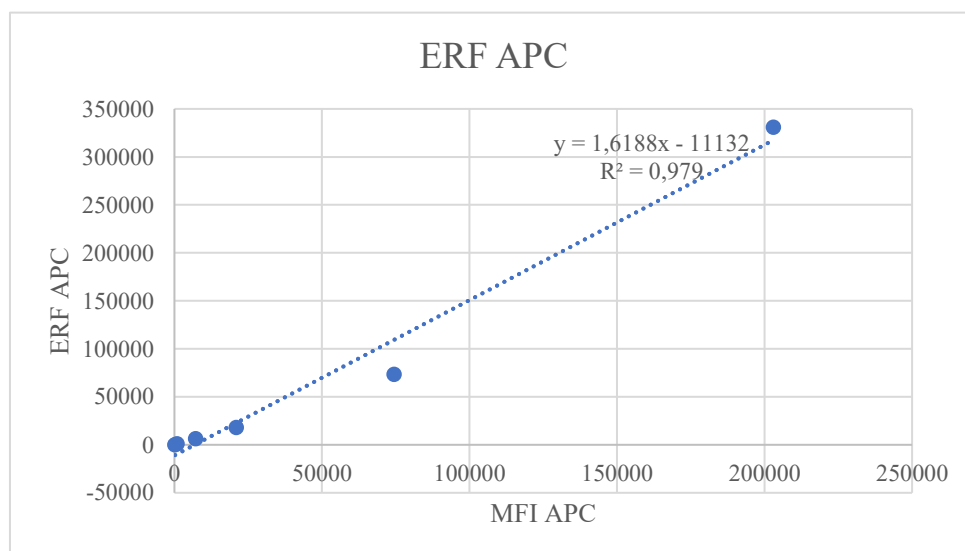
Pomocí programu FCM_{PASS} (verze 3.10) a měření Apogee Mix Calibration beads byla kalibrována velikost měřených částic. Rozpětí velikosti částic v EV gatě se při použití vysokých hodnot RI pro EV pohybovala mezi 350 a 2000 nm. Kalibrace velikosti částic je zobrazena na obrázku 28. Podle fluorescenčních kalibračních kuliček SPHERO™ Ultra Rainbow Quantitative Particle Kit rozpoznáváme při našem nastavení cytometru horní mez fluorescence pro kanál FITC do 209000 ekvivalentních referenčních jednotek fluoroforů (ERF; *equivalent reference fluorophores unit*), pro APC 331000 ERF, pro PE 1710000 ERF a pro BV421 3830000 ERF. Kalibrační kuličky s vyšší intenzitou fluorescence byly již mimo rozsah měření. Kalibrace intenzity fluorescence ze SPHERO™ Ultra Rainbow Quantitative Particle Kit jsou zobrazeny na obrázcích 29-32.



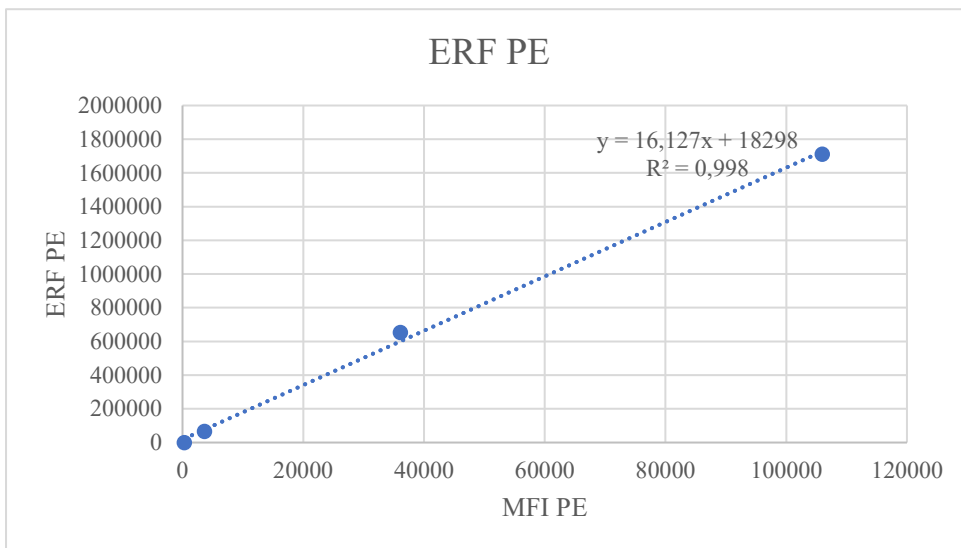
Obrázek 28: Kalibrace velikosti měřených částic v programu FCM_{PASS} (verze 3.10). Křivky kalibrující velikost měřených částic podle RI kalibračních kuliček. Použité Apogee Mix Calibration beads jsou zobrazeny v grafu červenými body. Kuličky z oxidu křemičitého: A – 240 nm; B – 300 nm; C – 590 nm; D – 800 nm; E – 1300 nm a polystyrenové kuličky F – 500 nm. Zelená čára zobrazuje kalibrační křivku pro velikost EV. Obrázek vygenerovaný z FCM_{PASS} (3.10)



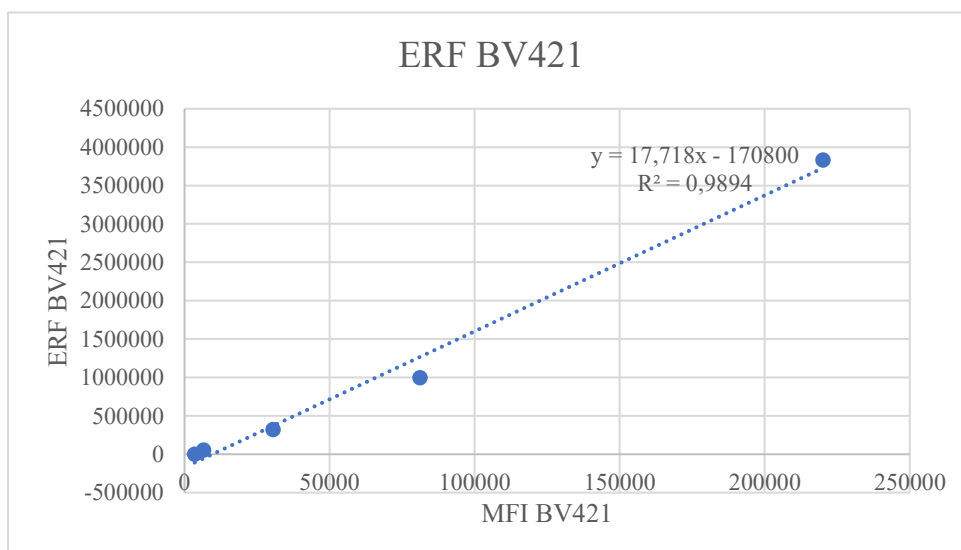
Obrázek 29: Kalibrace měřené fluorescence ve fluorescenčním kanálu FITC; ERF (ekvivalentní referenční jednotka fluoroforů; *equivalent reference fluorophores unit*)



Obrázek 30: Kalibrace měřené fluorescence ve fluorescenčním kanálu APC

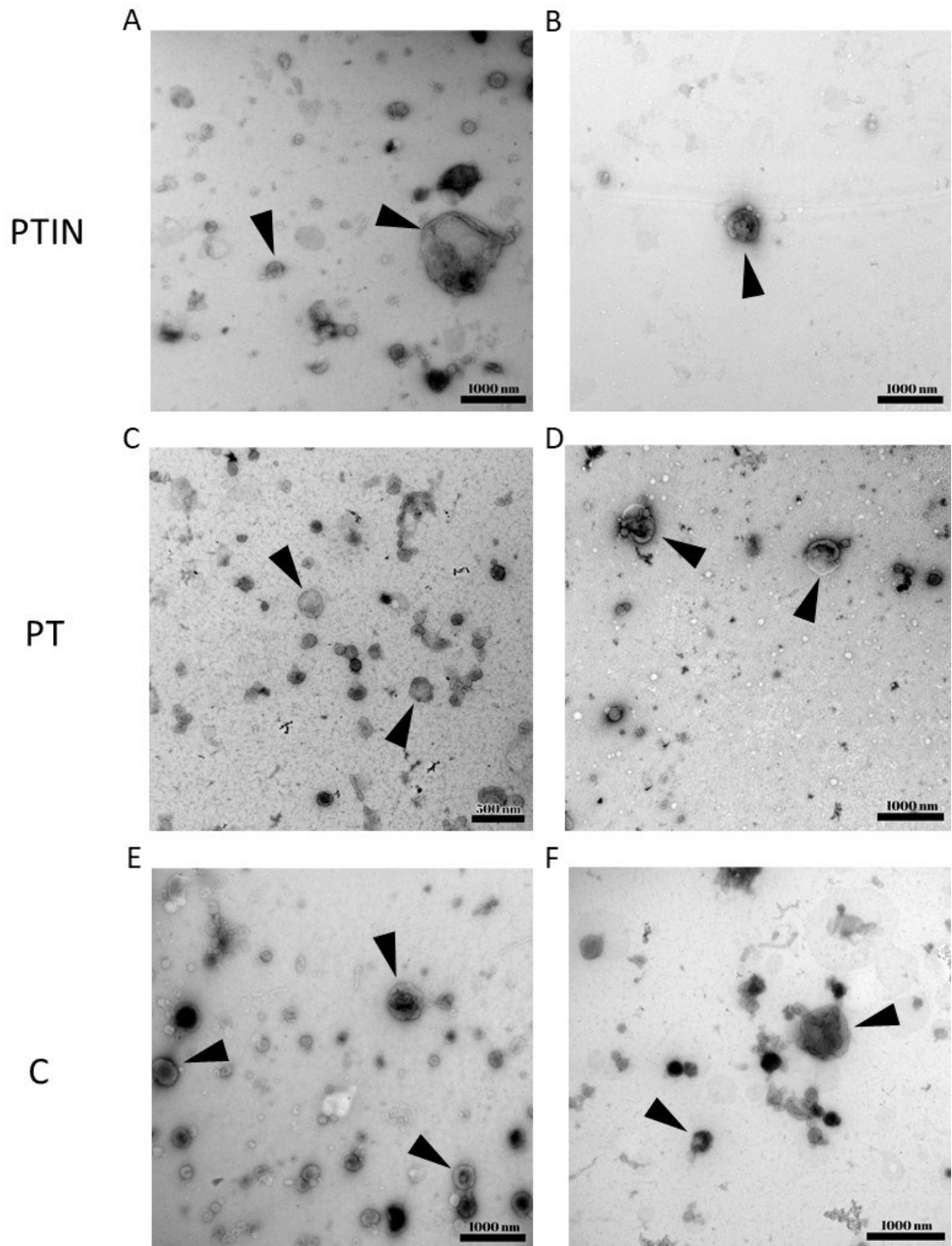


Obrázek 31: Kalibrace měřené fluorescence ve fluorescenčním kanálu PE



Obrázek 32: Kalibrace měřené fluorescence ve fluorescenčním kanálu BV421

5.2.4 Elektronová mikroskopie

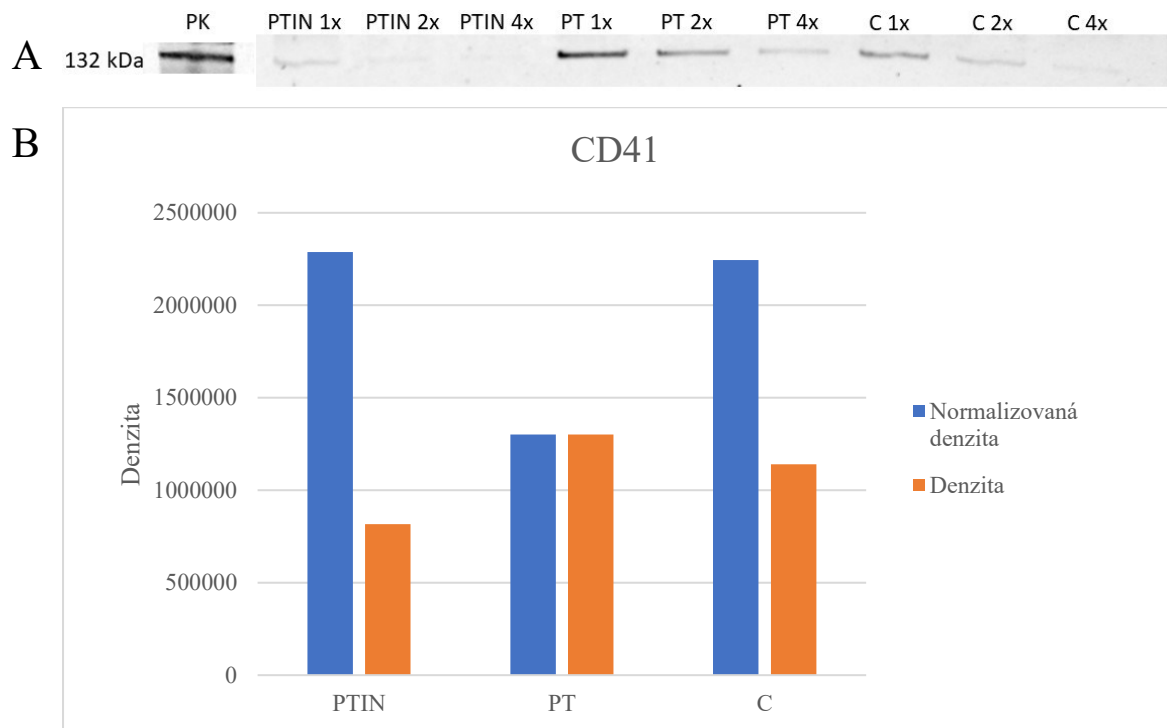


Obrázek 33: Kontrola přítomnosti EV ve vzorcích plasmy pomocí TEM. Vzorky byly připraveny stejným postupem jako vzorky na průtokovou cytometrii. A a B – Pacientské vzorky ze skupiny PTIN, zvětšení 25000 \times , měřítko 1000 nm; C a D – Pacientské vzorky ze skupiny PT, zvětšení: C 40000 \times , D 25000 \times , měřítko: C 500 nm, D 1000 nm; E a F – Pacientské vzorky ze skupiny C, zvětšení 25000 \times , měřítko 1000 nm; šipky označují vybrané EV;

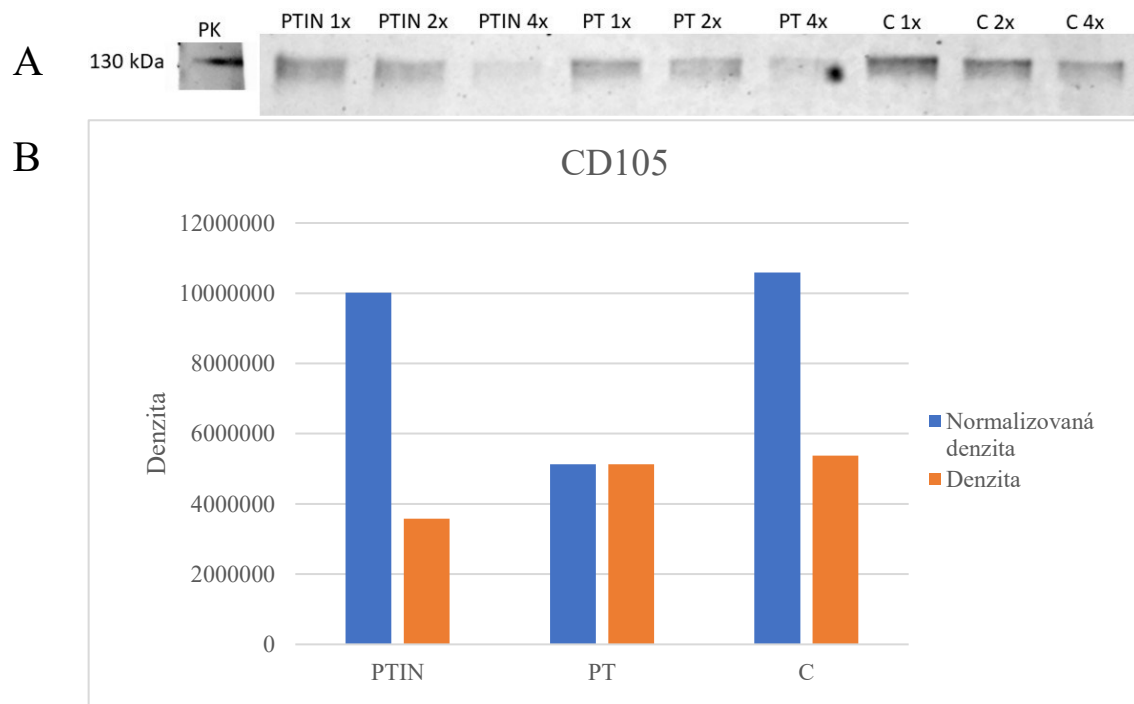
Obrázky na TEM byly pořízeny Mgr. Jakubem Soukupem.

5.2.5 Western blot

Pomocí western blotu jsme detekovali proteiny CD41 (obrázek 34A) a CD105 (obrázek 35A) přítomné ve směsných patientských vzorcích. Detekované proteiny jsme porovnávali na základě denzitometrie (obrázky 34B a 35B). Denzitometrie ukazuje nižší hodnotu ve skupině PTIN oproti PT při nanáše stejného množství proteinu (zjištěno pomocí BCA assaye). Data normalizovaná na stejný objem vzorku vykazují stejný trend jako při analýze pomocí cytometrie a to zvýšené množství proteinu u PTIN oproti PT a srovnatelné s C.



Obrázek 34: Denzitometrie western blotu značeného protilátkou proti CD41. A – obrázek membrány značené primární protilátkou proti CD41 a sekundární s navázaným fluoroforem; B – denzita (oranžové sloupce) při shodné nanáše proteinů a normalizovaná denzita (modré sloupce) po přepočtu na stejný objem nanesené plasmy. Zkratky: PK – pozitivní kontrola (nanáška krevních destiček).



Obrázek 35: Denzitometrie western blotu značeného protilátkou proti CD105. A – obrázek membrány značené primární protilátkou proti CD105 a sekundární s navázaným fluoroforem; B – Denzita (oranžové sloupce) při shodné nanášece proteinů a normalizovaná denzita (modré sloupce) po přepočtu na stejný objem plasmy. Zkratky: PK – pozitivní kontrola (nanáška HUVEC).

6 Diskuse

Pozorované změny počtu EV v tělních tekutinách v různých stavech organismu (Yoshioka *et al.*, 2014; Mege *et al.*, 2016) vedou k myšlence jejich diagnostického, případně prognostického potenciálu pro klinickou praxi (Nanou *et al.*, 2020). MS je diagnostikovaná pomocí magnetické rezonance a opírá se o celkovou anamnézu, případně vyšetření CSF (Thompson *et al.*, 2018). Diagnostika MS je poměrně komplikovaná s možnou chybovostí a nalezení nových biomarkerů by mohlo situaci výrazně ulehčit. Včasná diagnóza je nezbytná pro nástup léčby a udržení kvality života pacienta (Bove & Hauser, 2018). První část práce se věnovala možnému diagnostickému potenciálu EV v periferní krvi u pacientů s MS.

Podle doporučení ISEV (Théry *et al.*, 2018) byly k zajištění snížení signálu pozadí veškeré používané roztoky, včetně používaných protilátek nebo hnací kapaliny cytometru, filtrovány. Pro zjištění signálu pozadí při průtokové cytometrii byly měřeny nebarvené kontroly a samotný pufr (Kuiper *et al.*, 2020). Obě kontroly ukazovaly, že v analyzovaných, dvojitě pozitivních gatech, nebyl výskyt signálu zaznamenávaný. Identifikace falešné positivity nespécifickou vazbou protilátek byla ověřována na isotopových kontrolách (Welsh *et al.*, 2020a). Nespécifická vazba byla poměrně častá v gatech pozitivních na jeden marker, ale v analyzovaném, dvojitě pozitivním gatech, byl výskyt malý, ale určitá hladina detekce nespécificky značených částic je při daném způsobu analýzy EV zřejmě nevyhnutelná. V naší analýze jsme proto počítali s EV pozitivními na dva markery, kde je nižší výskyt nespécifického signálu, což vede ke zvýšení specifity značení EV (Erdbrügger *et al.*, 2014). Jako důkaz specifické detekce membránových částic byl vzorek změřen opakovaně po přidání detergentu rozrušujícího membrány (Welsh *et al.*, 2020a). Měření s detergentem TX100, který rozpouští membránové částice, ukázalo signifikantní snížení měřených částic ve všech analyzovaných gatech. To napovídá vysoce specifické detekci značených EV (Marcoux *et al.*, 2016) a nízké falešné pozitivitě signálu z přítomných proteinových agregátů (Salmond *et al.*, 2021). Jako důkaz přítomnosti EV ve vzorku byly vzorky zobrazeny na TEM (Coumans *et al.*, 2017).

Jednotlivé skupiny pro studii MS byly sestaveny podle neurologické kliniky VFN, kde ND představovali skupinu pacientů s MS, kteří ještě nebyli léčeni imunomodulační léčbou. Případné rozdíly počtu EV u ND od ostatních skupin by tak ukazovaly diagnostický potenciál EV. Pacienti ZL představovali skupinu různě léčených pacientů, u kterých však

nebyla léčba dostatečně účinná a muselo dojít k její změně. Žádný pacient ze skupiny ZL však nebyl léčený Natalizumabem. Pacienti léčení Natalizumabem byli zařazeni do skupiny N. Kontroly pro odlišení pacientů s MS od pacientů s jinými neurologickými potížemi byly zařazeny do skupiny NP. Zcela zdravé kontroly pak byly zařazeny do skupiny DK. Pacienti ze skupin NP a DK byli vybíráni podle věku a pohlaví, aby jejich počty a podíly odpovídaly patientským skupinám a analýza nebyla ovlivněna fyziologickými faktory (Danielson *et al.*, 2016).

Výsledky analýzy EV v periferní krvi ukázaly signifikantní rozdíly mezi stanovenými skupinami pacientů. Snížené počty EV u ZL pacientů v populacích T-lymfocytárních $CD3^+CD8a^+CD4^-$ EV oproti DK a B-lymfocytárních $CD20^+CD45^+$ oproti NP a N mohou být důsledkem léčby. Léčba MS je obecně imunomodulační (Scott, 2011; Smets *et al.*, 2017) a společně s inhibicí aktivity imunitních buněk může docházet i ke snížení produkce EV. Léčba Natalizumabem, protilátkou proti integrinu $\alpha4\beta1$, brání adhezi a prostupu lymfocytů do CNS (Dobson & Giovannoni, 2019) a vyšší výskyt B-lymfocytárních EV v periferní krvi u N oproti ZL může být způsobem právě zadržením B-lymfocytů v periferní krvi místo prostupu do CNS. Stejný trend ale nebyl pozorován u T-lymfocytárních EV. Oproti dříve popsanému zvýšenému výskytu endoteliálních EV u MS pacientů oproti zdravým kontrolám (Minagar *et al.*, 2001; Alexander *et al.*, 2015) jsme stejný trend u ND a DK nezaznamenali. Navzdory chronické aktivaci a hyperaktivitě krevních destiček při MS (Morel *et al.*, 2017) a popsanému zvýšenému počtu destičkových EV u pacientů s MS (Sheremata *et al.*, 2008) jsme nepozorovali žádné signifikantní rozdíly mezi analyzovanými skupinami v hladinách destičkových $CD36^+CD41^+$ EV. To může být způsobeno odlišnou metodikou ve zpracování vzorků i při jejich analýze. Veškeré sledované signifikantní rozdíly ukazují překryv počtů EV mezi jednotlivými skupinami a jejich diagnostický potenciál tak nebyl v našich podmínkách potvrzen.

Druhá část této práce se věnovala diagnostickému potenciálu EV v pupečnickové krvi předčasně narozených novorozenců. Záněty předčasně narozených novorozenců jsou spojené s častou novorozeneckou morbiditou (Gomez *et al.*, 1998). Přežití pomáhá včasná diagnostika systémového zánětu a podání glukokortikoidů (Galinsky *et al.*, 2013). Současná diagnostika probíhá pomocí stanovení hladiny IL-6 z plasmy novorozenců, ale pro zlepšení stanovení diagnózy a prognózy jsou hledány další markery zánětu (Berka *et al.*, 2021). Vzhledem k nízké porodní hmotnosti předčasně narozených novorozenců

představuje pupečnicková krev zajímavý alternativní materiál využitelný pro možnou diagnostiku bez nutnosti odebírat krev novorozencům.

Stejně jako u studie MS byly pro zjištění signálu pozadí měřeny kontroly samotného pufru a nebarvených kontrol (Welsh *et al.*, 2020a). V obou případech kontroly ukázaly, že se ve dvojitě pozitivním gate nevyskytují EV. Identifikace falešné positivity byla navíc ověřena měřeními isotypových kontrol. U polyklonální protilátky anti-Syncytin-1(CF647) byla místo isotypové kontroly použita protilátka s přidáním blokačního peptidu. Isotypové kontroly opět ukázaly malý výskyt nespecificky značených EV ve dvojitě pozitivním gate. Na rozdíl od analýzy EV u pacientů s MS byly pro studii EV v pupečnickové krvi přidány na základě doporučení Welsh *et al.* (2020a) také kontroly interference fluoroforu a to jednobarevné kontroly a FMO. Obě kontroly ukazovaly stejně jako isotypové kontroly relativně malý výskyt EV ve dvojitě pozitivních gatech, což ukazují i jiné publikované práce (Kandzija *et al.*, 2019). Ověření přítomnosti membránových částic bylo opět ověřeno měřeními vzorku s detergentem. Po přidání TX100 došlo k signifikantnímu snížení měřených EV ve dvojitě pozitivních gatech. To potvrzuje detekci specificky značených membránových EV namísto nespecifického signálu proteinových agregátů, které se přidavkem TX100 nerozpouští (Salmond *et al.*, 2021). Efekt roje byl vyloučen sériovým ředěním vzorku. Pokles počtu detekovaných EV ve vzorku odpovídal zvyšujícímu ředění a současné zachování MFI ukazuje na malé zastoupení koincidenčního změření více EV při analýze (Welsh *et al.*, 2020a).

Skupiny pro studii EV v pupečnickové krvi byly stanoveny kliniky na ÚPMD podle gestačního věku a koncentrace IL-6. Pacienti v kontrolních skupinách byli vybíráni tak, aby byl co nejlépe zachován poměr chlapců a dívek. Pro snížení subjektivního vlivu při analýze byla studie zaslepená. Odslepení vzorků probíhalo až po vyhodnocení cytometrických dat a před závěrečným statistickým zpracováním. V předchozí studii v naší laboratoři jsme zjistili, že hemolytické vzorky mají vyšší výskyt EV (Hujacova *et al.*, 2021). Po stanovení volného hemoglobinu proto byly hemolytické vzorky z analýzy vyřazeny. Samotná analýza ukazovala signifikantně zvýšené počty placentárních EV u PTIN oproti PT. Hladiny placentárních EV v PTIN byly často podobné jako u C. Bylo popsáno, že s postupujícím těhotenstvím stoupá celkový počet EV v periferní krvi matky i pupečnickové krvi novorozenců a vyšší hladiny EV u donošených novorozenců jsou pravděpodobně fyziologickým jevem. V průběhu těhotenství také postupně dochází ke zvýšení exprese

PLAP na placentě (Okamoto *et al.*, 1990) a vyšší hladiny placentárních EV u C mohou být způsobené i vyšším zastoupením PLAP na EV. Vyšší počet navázaných protilátek proti markerům na povrchu EV tak zvyšuje fluorescenční signál. EV se díky tomu mohou dostat nad detekční limit cytometru (Stoner *et al.*, 2016). Zvýšení počtu EV u PTIN pak může odrážet zánětlivý stav placenty, podobně jako je tomu u vyššího výskytu placentárních EV při P-Ec (Campello *et al.*, 2015). Signifikantně vyšší počty EV u PTIN oproti PT byly pozorovány i u populací endoteliálních a destičkových EV. Destičkové CD36⁺CD41⁺ EV pozitivní i na aktivační marker CD62P (P-selektin) (Gasecka *et al.*, 2017) neukazovaly na rozdíl od EV značených pouze CD36⁺CD41⁺ signifikantní rozdíly v hladinách mezi skupinami. Důvodem může být nižší zastoupení aktivačního markeru na povrchu EV, které může být pod detekčním limitem cytometru (Kuiper *et al.*, 2020). Obecně membrány EV byly značeny pomocí CellMaskTM a fosfatidylserin pomocí Lactadherinu. Lactadherin váže fosfatidylserin, na rozdíl od Annexinu V, bez potřebné přítomnosti Ca²⁺ (Shi *et al.*, 2004). Ca²⁺ zvyšuje produkci EV z krevních destiček (Dachary – Prigent *et al.*, 1995), proto se při analýze EV hodí ke značení fosfatidylserinu právě Lactadherin. Značení membrán a povrchového fosfatidylserinu neukázalo žádné signifikantní výsledky mezi stanovenými skupinami.

Počty jednotlivých populací EV byly korelovány s klinickými faktory novorozenců. Nejvyšší korelační koeficient $S_r = 0,4$ ($p = 0,0006$) přinesla analýza počtu CD31⁺CD105⁺CD146⁺ endotelových EV s koncentrací IL-6 v krvi novorozenců. Korelace počtu EV s dalšími markery zánětu u novorozenců, jako CRP nebo PCT (Berka *et al.*, 2021) nebyla prokázána. Signifikantní korelační koeficienty ukazovala také korelace počtu EV s koncentrací volného hemoglobinu v plasmě a to u EV s povrchovým fosfatidylserinem, nebo destičkovými CD36⁺CD41⁺ EV, které podporuje dříve publikovaná data o signifikantně zvýšeném počtu destičkových EV u hemolytických vzorků (Hujacova *et al.*, 2021).

Pro standardizaci měření byla data kalibrována na standartní velikost v nm pomocí Software FCM_{PASS} (Welsh *et al.*, 2020b). Výsledná kalibrace ukazuje, že námi analyzované částice v EV gatě jsou ve velikosti od přibližně 350 nm do 2000 nm. To odpovídá měření velkých EV (Gandham *et al.*, 2020), ale lepšímu rozlišení, než mají běžné cytometry v klinické praxi s detekčním limitem 500 nm (Szatanek *et al.*, 2017). V případě kalibrace fluorescence jsme použili kalibrační kuličky dle doporučení ISEV (Welsh *et al.*, 2020a), ale

naměřené kuličky se ukázaly jako nedostatečné pro použití kalibračního softwaru. Fluorescence kalibračních kuliček SPHERO™ Ultra Rainbow Quantitative Particle Kit je příliš vysoká a nepokrývá oblast detekce při analýze EV. Při citlivém nastavení cytometru pro měření EV nebylo možné rozpoznat všechny populace kalibračních kuliček, které jsou potřebné pro kalibraci pomocí software FCM_{PASS}. Nicméně získané regresní přímky kalibrace mohou být použity k porovnání citlivosti detektorů námi používaného přístroje s jinými cytometry. Nově se na trhu začínají objevovat kalibrační kuličky s nižší fluorescencí, které by mohly být vhodnější pro kalibraci měření EV s nízkou MFI (Kuiper *et al.*, 2020).

Přítomnost EV byla prokázána zobrazením pomocí TEM (Coumans *et al.*, 2017). Na pořízených snímcích jsou vidět klasické sférické EV, zdeformované vlivem fixace a značením sloučeninami uranu do typického mističkového tvaru (Szatanek *et al.*, 2017). Pomocí TEM monitorujeme čistotu vzorku a přítomnost agregovaných EV, které by mohly ovlivňovat signál při měření průtokovou cytometrií (Rikkert *et al.*, 2019). Při izolaci EV pro TEM jsme simulovali přípravu vzorků pro průtokovou cytometrii. Velikost EV na snímcích se nejčastěji pohybovala mezi 100 a 300 nm. Ojedinele se vyskytovaly i EV ve velikosti do 1200 nm. Údaje o velikosti z TEM je nicméně potřeba interpretovat opatrně, vzhledem k fixaci, v důsledku, které se velikost oproti nativnímu stavu zmenšuje (van der Pol *et al.*, 2014b). Pro detekci celkové hladiny vybraných sledovaných markerů ve frakci EV jsme použili metodu Western blot (Gardiner *et al.*, 2016). Denzitometrické vyhodnocení signálu po značení protilátkami proti CD41 a CD105 podporuje cytometrií nalezený trend zvýšeného výskytu EV s povrchovými CD41 i CD105 u PTIN oproti PT.

V této práci jsme optimalizovali analýzu EV pomocí průtokového cytometru, který byl vylepšen přidáním silnějšího 405nm laseru a detektoru VSSC pro vyšší senzitivitu a rozlišovací schopnost (Pekárková *et al.*, 2021). Podle kritérií analýzy EV pomocí průtokové cytometrie (Welsh *et al.*, 2020a) jsme zařadili potřebné a požadované kontroly správné analýzy. Kalibrace dat přispívá porovnatelnosti výsledků s jinými cytometry. Přítomnost EV jsme ověřili pomocí TEM a trend exprese vybraných proteinů pomocí western blotu. Ukázali jsme signifikantní rozdíly mezi patientskými skupinami, a to jak v analýze EV v periferní krvi pacientů s MS, tak při analýze pupečnickové krve u předčasně narozených novorozenců. Překryv počtů EV v jednotlivých skupinách však naznačuje, že

v současné době za využití dostupné techniky není možné klinicky použít analýzu EV k diagnostice MS ani zánětů u předčasně narozených novorozenců.

7 Závěr

Provedli jsme rozsáhlou optimalizaci analýzy EV pomocí průtokového cytometru včetně zavedení řady kontrol vycházejících ze současných doporučení ISEV. Nalezli jsme signifikantní rozdíly v počtech T-lymfocytárních, B-lymfocytárních a endoteliálních EV v periferní krvi pacientů s MS oproti kontrolám. Analýza byla doplněna o měření kontrolních vzorků podle doporučení ISEV. Přítomnost EV v periferní krvi byla ověřena pomocí TEM.

Dále jsme popsali signifikantní rozdíly v počtu placentárních, endoteliálních a destičkových EV v pupečnickové krvi u předčasně narozených novorozenců se zánětem, oproti předčasně narozeným novorozencům bez zánětu. Počty destičkových EV a EV s povrchovým fosfatidylserinem slabě korelovaly s koncentrací volného hemoglobinu ve vzorku. Počet endoteliálních EV pak signifikantně koreloval s koncentrací IL-6 v krvi novorozenců. K analýze byly podle předpisů ISEV přidány doporučené kontroly. Expres některých sledovaných proteinů byla ověřena pomocí metody western blot. Přítomné EV byly zobrazeny pomocí TEM.

Výsledky naší práce ukazují signifikantní rozdíly mezi stanovenými skupinami pacientů, ale velký rozptyl dat a jejich překryv mezi jednotlivými experimentálními skupinami ukazuje, že v současné době analýza počtu EV pomocí průtokové cytometrie nepředstavuje nadějnou metodu pro diagnostiku MS nebo zánětů u předčasně narozených novorozenců v klinické praxi.

8 Použitá literatura

- *Aalberts, M., Stout, T. A., & Stoorvogel, W. (2014). Prostatosomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction*, 147(1), R1-14.
- Aatonen, M. T., Öhman, T., Nyman, T. A., Laitinen, S., Grönholm, M., & Siljander, P. R. M. (2014). Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 3(1), 24692.
- *Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176.
- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J. J., Laheesmaa, R., Norman, M., Gabrielsson, S. et al. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *The Journal of immunology*, 179(3), 1969-1978.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology*, 10(5), 619-624.
- Alexander, J. S., Chervenak, R., Weinstock-Guttman, B., Tsunoda, I., Ramanathan, M., Martinez, N., Zivadinov, R. et al. (2015). Blood circulating microparticle species in relapsing–remitting and secondary progressive multiple sclerosis. A case–control, cross sectional study with conventional MRI and advanced iron content imaging outcomes. *Journal of the neurological sciences*, 355(1-2), 84-89.
- Arkesteijn, G. J., Lozano-Andrés, E., Libregts, S. F., & Wauben, M. H. (2020). Improved Flow Cytometric Light Scatter Detection of Submicron-Sized Particles by Reduction of Optical Background Signals. *Cytometry Part A*, 97(6), 610-619.
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J. M., Mornet, S., & Brisson, A. R. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(5), 614-627.
- Arraud, N., Gounou, C., Linares, R., & Brisson, A. R. (2015). A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(2), 237-247.
- Arraud, N., Gounou, C., Turpin, D., & Brisson, A. R. (2016). Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 89(2), 184-195.
- Berka, I., Korček, P., & Straňák, Z. (2021). C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in diagnosis of late-onset bloodstream infection in very preterm infants. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 10(11), 1004-1008.
- Bernard, C. C., & de Rosbo, N. K. (1992). Multiple sclerosis: an autoimmune disease of multifactorial etiology. *Current opinion in immunology*, 4(6), 760-765.

- Bove, R. M., & Hauser, S. L. (2018). Diagnosing multiple sclerosis: Art and science. *The Lancet Neurology*, 17(2), 109-111.
- Campello, E., Spiezia, L., Radu, C. M., Dhima, S., Visentin, S., Dalla Valle, F., Simioni, P. et al. (2015). Circulating microparticles in umbilical cord blood in normal pregnancy and pregnancy with preeclampsia. *Thrombosis research*, 136(2), 427-431.
- Cappellano, G., Raineri, D., Rolla, R., Giordano, M., Puricelli, C., Vilardo, B., Chiocchetti, A. et al., (2021). Circulating platelet-derived extracellular vesicles are a hallmark of Sars-Cov-2 infection. *Cells*, 10(1), 85.
- *Carandini, T., Colombo, F., Finardi, A., Casella, G., Garzetti, L., Verderio, C., & Furlan, R. (2015). Microvesicles: what is the role in multiple sclerosis? *Frontiers in neurology*, 6, 111.
- Choi, D., Montermini, L., Jeong, H., Sharma, S., Meehan, B., & Rak, J. (2019). Mapping subpopulations of cancer cell-derived extracellular vesicles and particles by nano-flow cytometry. *ACS nano*, 13(9), 10499-10511.
- Confavreux, C., Aimard, G., & Devic, M. (1980). Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain: a journal of neurology*, 103(2), 281-300.
- Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M. M., Cortinovis-Tourniaire, P., Moreau, T., & Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 339(5), 285-291.
- Court, F. A., Midha, R., Cisterna, B. A., Grochmal, J., Shakhbazau, A., Hendriks, W. T., & Van Minnen, J. (2011). Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia*, 59(10), 1529-1539.
- *Coumans, F. A., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E., El-Andaloussi, S., Nieuwland, R. et al. (2017). Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circulation research*, 120(10), 1632-1648.
- Dachary-Prigent, J., Pasquet, J. M., Freyssinet, J. M., & Nurden, A. T. (1995). Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca²⁺-ATPase inhibitors. *Biochemistry*, 34(36), 11625-11634.
- Danielson, K. M., Estanislau, J., Tigges, J., Toxavidis, V., Camacho, V., Felton, E. J., Ghiran, I. et al. (2016). Diurnal variations of circulating extracellular vesicles measured by nano flow cytometry. *PloS one*, 11(1), e0144678.
- Dobson, R., Ramagopalan, S., Davis, A., & Giovannoni, G. (2013). Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 84(8), 909-914.
- *Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis—a review. *European journal of neurology*, 26(1), 27-40.

- Ebers, G. C., Bulman, D. E., Sadovnick, A. D., Paty, D. W., Warren, S., Hader, W., Brunet, D. et al. (1986). A population-based study of multiple sclerosis in twins. *New England Journal of Medicine*, 315(26), 1638-1642.
- Erdbrügger, U., Rudy, C. K., Etter, M., Dryden, K. A., Yeager, M., Klibanov, A. L., & Lannigan, J. (2014). Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry. *Cytometry Part A*, 85(9), 756-770.
- Filippi, M., Rocca, M. A., Ciccarelli, O., De Stefano, N., Evangelou, N., Kappos, L., Rovira, A. et al. (2016). MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *The Lancet Neurology*, 15(3), 292-303.
- Fendl, B., Weiss, R., Fischer, M. B., Spittler, A., & Weber, V. (2016). Characterization of extracellular vesicles in whole blood: influence of pre-analytical parameters and visualization of vesicle-cell interactions using imaging flow cytometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(1), 168-173.
- *Foster, B. P., Balassa, T., Benen, T. D., Dominovic, M., Elmadjian, G. K., Florova, V., Markert, U. R. et al. (2016). Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 53(6), 379-395.
- Frängsmyr, L., Baranov, V., Nagaeva, O., Stendahl, U., Kjellberg, L., & Mincheva-Nilsson, L. (2005). Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Molecular human reproduction*, 11(1), 35-41.
- Frühbeis, C., Helmig, S., Tug, S., Simon, P., & Krämer-Albers, E. M. (2015). Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *Journal of extracellular vesicles*, 4(1), 28239.
- *Galinsky, R., Polglase, G. R., Hooper, S. B., Black, M. J., & Moss, T. J. (2013). The consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development. *Journal of pregnancy*, 2013, 1-11
- *Gandham, S., Su, X., Wood, J., Nocera, A. L., Alli, S. C., Milane, L., Ivanov, A. R. et al. (2020). Technologies and standardization in research on extracellular vesicles. *Trends in biotechnology*, 38(10), 1066-1098.
- Gardiner, C., Vizio, D. D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of extracellular vesicles*, 5(1), 32945.
- *Gasecka, A., Böing, A. N., Filipiak, K. J., & Nieuwland, R. (2017). Platelet extracellular vesicles as biomarkers for arterial thrombosis. *Platelets*, 28(3), 228-234.
- Gasser, O., & Schifferli, J. A. (2004). Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*, 104(8), 2543-2548.

- Gatson, N. N., Williams, J. L., Powell, N. D., McClain, M. A., Hennon, T. R., Robbins, P. D., & Whitacre, C. C. (2011). Induction of pregnancy during established EAE halts progression of CNS autoimmune injury via pregnancy-specific serum factors. *Journal of neuroimmunology*, 230(1-2), 105-113.
- Géminard, C., De Gassart, A., Blanc, L., & Vidal, M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic*, 5(3), 181-193.
- Germain, S. J., Sacks, G. P., Soorana, S. R., Sargent, I. L., & Redman, C. W. (2007). Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *The Journal of Immunology*, 178(9), 5949-5956.
- *Ghulmiyyah, L., & Sibai, B. (2012). Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. In *Seminars in perinatology*, 36(1), 56-59.
- Göhner, C., Weber, M., Tannetta, D. S., Groten, T., Plösch, T., Faas, M. M., Fitzgerald, J. S. et al. (2015). A new enzyme-linked sorbent assay (ELSA) to quantify syncytiotrophoblast extracellular vesicles in biological fluids. *American Journal of Reproductive Immunology*, 73(6), 582-588.
- Gomez, R., Romero, R., Ghezzi, F., Yoon, B. H., Mazor, M., & Berry, S. M. (1998). The fetal inflammatory response syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*, 179(1), 194-202.
- Gregg, C., Shikar, V., Larsen, P., Mak, G., Chojnacki, A., Yong, V. W., & Weiss, S. (2007). White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS. *Journal of Neuroscience*, 27(8), 1812-1823.
- Han, C., Wang, C., Chen, Y., Wang, J., Xu, X., Hilton, T., Zhang, J. et al. (2020). Placenta-derived extracellular vesicles induce preeclampsia in mouse models. *Haematologica*, 105(6), 1686.
- *Hauser, S. L., & Cree, B. A. (2020). Treatment of multiple sclerosis: a review. *The American Journal of Medicine*, 133(12), 1380-1390.
- Hujacova, A., Sirc, J., Pekarkova, K., Brozova, T., Kostelanska, M., Soukup, J., Stranak, Z. et al. (2021). Large Platelet and Endothelial Extracellular Vesicles in Cord Blood of Preterm Newborns: Correlation with the Presence of Hemolysis. *Diagnostics*, 11(8), 1316.
- *Hurley, J. H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current opinion in cell biology*, 20(1), 4-11.
- Jin, X., Chen, Y., Chen, H., Fei, S., Chen, D., Cai, X., Xie, C. et al. (2017). Evaluation of tumor-derived exosomal miRNA as potential diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer using next-generation sequencing. *Clinical Cancer Research*, 23(17), 5311-5319.

- Kandzija, N., Zhang, W., Motta-Mejia, C., Mhlomi, V., McGowan-Downey, J., James, T., Vatish, M. et al. (2019). Placental extracellular vesicles express active dipeptidyl peptidase IV; levels are increased in gestational diabetes mellitus. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1617000.
- Knight, M., Redman, C. W., Linton, E. A., & Sargent, I. L. (1998). Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 105(6), 632-640.
- *Kuiper, M., van de Nes, A., Nieuwland, R., Varga, Z., & van der Pol, E. (2020). Reliable measurements of extracellular vesicles by clinical flow cytometry. *American Journal of Reproductive Immunology*, 85(2), e13350.
- *Lai, C. P. K., & Breakefield, X. O. (2012). Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Frontiers in physiology*, 3, 228.
- Lalic-Cosic, S., Dopsaj, V., Kovac, M., Mandic-Markovic, V., Mikovic, Z., Mobarrez, F., & Antovic, A. (2021). Phosphatidylserine Exposing Extracellular Vesicles in Pre-eclamptic Patients. *Frontiers in Medicine*, 8(761453)
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., Black, R. E. et al. (2016). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *The Lancet*, 388(10063), 3027-3035.
- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabro, L., Spada, M., Fais, S. et al. (2009). High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PloS one*, 4(4), e5219.
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Théry, C., et al. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 3(1), 26913.
- Marcoux, G., Duchez, A. C., Cloutier, N., Provost, P., Nigrovic, P. A., & Boilard, E. (2016). Revealing the diversity of extracellular vesicles using high-dimensional flow cytometry analyses. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- *Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature cell biology*, 21(1), 9-17.
- *Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*, 73(10), 1907-1920.
- McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., Wolinsky, J. S. et al. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 50(1), 121-127.

- Mege, D., Panicot-Dubois, L., Ouaiissi, M., Robert, S., Sielezneff, I., Sastre, B., Dubois, C. et al. (2016). The origin and concentration of circulating microparticles differ according to cancer type and evolution: A prospective single-center study. *International journal of cancer*, 138(4), 939-948.
- Messerli, M., May, K., Hansson, S. R., Schneider, H., Holzgreve, W., Hahn, S., & Rusterholz, C. (2010). Feto-maternal interactions in pregnancies: placental microparticles activate peripheral blood monocytes. *Placenta*, 31(2), 106-112.
- *Milane, L., Singh, A., Mattheolabakis, G., Suresh, M., & Amiji, M. M. (2015). Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*, 219, 278-294.
- Minagar, A., Jy, W., Jimenez, J. J., Sheremata, W. A., Mauro, L. M., Mao, W. W., Ahn, Y. S. et al. (2001). Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology*, 56(10), 1319-1324.
- *Mincheva-Nilsson, L., & Baranov, V. (2010). The role of placental exosomes in reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6), 520-533.
- *Mincheva-Nilsson, L., & Baranov, V. (2014). Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *American journal of reproductive immunology*, 72(5), 440-457.
- Morel, A., Rywaniak, J., Bijak, M., Miller, E., Niwald, M., & Saluk, J. (2017). Flow cytometric analysis reveals the high levels of platelet activation parameters in circulation of multiple sclerosis patients. *Molecular and cellular biochemistry*, 430(1), 69-80.
- *Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles*, 3(1), 24641.
- Nanou, A., Coumans, F. A., van Dalum, G., Zeune, L. L., Dolling, D., Onstenk, W., Terstappen, L. W. et al. (2018). Circulating tumor cells, tumor-derived extracellular vesicles and plasma cytokeratins in castration-resistant prostate cancer patients. *Oncotarget*, 9(27), 19283.
- Nanou, A., Miller, M. C., Zeune, L. L., de Wit, S., Punt, C. J., Groen, H. J., Terstappen, L. W. et al. (2020). Tumour-derived extracellular vesicles in blood of metastatic cancer patients associate with overall survival. *British journal of cancer*, 122(6), 801-811.
- *van Niel, G., d'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(4), 213-228.
- *van Niel, G., Carter, D. R., Clayton, A., Lambert, D. W., Raposo, G., & Vader, P. (2022). Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 369–382.
- Noe, D. A., Weedn, V., & Bell, W. R. (1984). Direct spectrophotometry of serum hemoglobin: an Allen correction compared with a three-wavelength polychromatic analysis. *Clinical chemistry*, 30(5), 627-630.

- Okamoto, T., Seo, H., Mano, H., Furuhashi, M., Goto, S., Tomoda, Y., & Matsui, N. (1990). Expression of human placenta alkaline phosphatase in placenta during pregnancy. *Placenta*, 11(4), 319-327.
- Ostenfeld, M. S., Jensen, S. G., Jeppesen, D. K., Christensen, L. L., Thorsen, S. B., Stenvang, J., Andersen, C. L. et al. (2016). miRNA profiling of circulating EpCAM⁺ extracellular vesicles: promising biomarkers of colorectal cancer. *Journal of extracellular vesicles*, 5(1), 31488.
- Pekárková, K., Soukup, J., Kostelanská, M., Širc, J., Straňák, Z., & Holada, K. (2021). Cord blood extracellular vesicles analyzed by flow cytometry with thresholding using 405 nm or 488 nm laser leads to concurrent results. *Diagnostics*, 11(8), 1320.
- Pelletier, F., Garnache-Ottou, F., Angelot, F., Biichlé, S., Vidal, C., Humbert, P., Aubin, F. et al. (2011). Increased levels of circulating endothelial-derived microparticles and small-size platelet-derived microparticles in psoriasis. *Journal of investigative dermatology*, 131(7), 1573-1576.
- van der Pol, E., Van Gemert, M. J. C., Sturk, A., Nieuwland, R., & Van Leeuwen, T. G. (2012). Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(5), 919-930.
- van der Pol, E., Coumans, F. A., Sturk, A., Nieuwland, R., & van Leeuwen, T. G. (2014a). Refractive index determination of nanoparticles in suspension using nanoparticle tracking analysis. *Nano letters*, 14(11), 6195-6201.
- van der Pol, E., Coumans, F. A. W., Grootemaat, A. E., Gardiner, C., Sargent, I. L., Harrison, P., Nieuwland, R. et al. (2014b). Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(7), 1182-1192.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H. P., Kappos, L., Wolinsky, J. S. et al. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 58(6), 840-846.
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Wolinsky, J. S. et al. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*, 69(2), 292-302.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*, 183(3), 1161-1172.
- *Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S., & Poirot, M. (2011). Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical pharmacology*, 81(10), 1171-1182.

- *Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(1), 108-120.
- Reddy, A., Zhong, X. Y., Rusterholz, C., Hahn, S., Holzgreve, W., Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2008). The effect of labour and placental separation on the shedding of syncytiotrophoblast microparticles, cell-free DNA and mRNA in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta*, 29(11), 942-949.
- Rikkert, L. G., Nieuwland, R., Terstappen, L. W. M. M., & Coumans, F. A. W. (2019). Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1555419.
- *Robbins, P. D. (2017). Extracellular vesicles and aging. *Stem cell investigation*, 4.
- Robert, S., Lacroix, R., Poncelet, P., Harhour, K., Bouriche, T., Judicone, C., Dignat-George, F. et al. (2012). High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles—brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(4), 1054-1058.
- de Rond, L., Coumans, F. A., Nieuwland, R., van Leeuwen, T. G., & van der Pol, E. (2018a). Deriving extracellular vesicle size from scatter intensities measured by flow cytometry. *Current protocols in cytometry*, 86(1), e43.
- de Rond, L., Van Der Pol, E., Hau, C. M., Varga, Z., Sturk, A., Van Leeuwen, T. G., Coumans, F. A. et al. (2018b). Comparison of generic fluorescent markers for detection of extracellular vesicles by flow cytometry. *Clinical chemistry*, 64(4), 680-689.
- *Ruivo, C. F., Adem, B., Silva, M., & Melo, S. A. (2017). The biology of cancer exosomes: insights and new perspectives. *Cancer research*, 77(23), 6480-6488.
- Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C., & Taylor, D. D. (2006). Specific Isolation of Placenta-Derived Exosomes from the Circulation of Pregnant Women and Their Immunoregulatory Consequences 1. *American Journal of Reproductive Immunology*, 56(5-6), 345-355.
- *Sáenz-Cuesta, M., Osorio-Querejeta, I., & Otaegui, D. (2014). Extracellular vesicles in multiple sclerosis: what are they telling us? *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 100.
- Salmond, N., Khanna, K., Owen, G. R., & Williams, K. C. (2021). Nanoscale flow cytometry for immunophenotyping and quantitating extracellular vesicles in blood plasma. *Nanoscale*, 13(3), 2012-2025.
- Sang, Q., Yao, Z., Wang, H., Feng, R., Wang, H., Zhao, X., Wang, L. et al. (2013). Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(7), 3068-3079.
- *Scott, L. J. (2011). Fingolimod. *CNS drugs*, 25(8), 673-698.

- Sheremata, W. A., Jy, W., Horstman, L. L., Ahn, Y. S., Alexander, J. S., & Minagar, A. (2008). Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 5(1), 1-6.
- Shi, J., Heegaard, C. W., Rasmussen, J. T., & Gilbert, G. E. (2004). Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1667(1), 82-90.
- *Smets, I., Van Deun, L., Bohyn, C., Van Pesch, V., Vanopdenbosch, L., Dive, D., Dubois, B. et al. (2017). Corticosteroids in the management of acute multiple sclerosis exacerbations. *Acta Neurologica Belgica*, 117(3), 623-633.
- *Spinillo, A., Iacobone, A. D., Calvino, I. G., Alberi, I., & Gardella, B. (2014). The role of the placenta in fetoneonatal infections. *Early Human Development*, 90, S7-S9.
- Stoner, S. A., Duggan, E., Condello, D., Guerrero, A., Turk, J. R., Narayanan, P. K., & Nolan, J. P. (2016). High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles. *Cytometry Part A*, 89(2), 196-206.
- *Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1153.
- Tamagawa-Mineoka, R., Katoh, N., & Kishimoto, S. (2010). Platelet activation in patients with psoriasis: increased plasma levels of platelet-derived microparticles and soluble P-selectin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 62(4), 621-626.
- *Tannetta, D., Dragovic, R., Alyahyaei, Z., & Southcombe, J. (2014). Extracellular vesicles and reproduction—promotion of successful pregnancy. *Cellular & molecular immunology*, 11(6), 548-563.
- *Tannetta, D., Masliukaite, I., Vatish, M., Redman, C., & Sargent, I. (2017). Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Journal of reproductive immunology*, 119, 98-106.
- Teo, B. H. D., & Wong, S. H. (2010). MHC class II-associated invariant chain (Ii) modulates dendritic cells-derived microvesicles (DCMV)-mediated activation of microglia. *Biochemical and biophysical research communications*, 400(4), 673-678.
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Jovanovic-Taliman, T. et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750.
- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Cohen, J. A. et al. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 17(2), 162-173.

- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Simons, M. et al. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244-1247.
- Tranquilli, A., Dekker, G., Magee, L., Roberts, J., Sibai, B. M., Steyn, W., Brown, M. A. et al. (2014). The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP. *Pregnancy hypertension*, 4(2), 97-104.
- *Upadhy, R., & Shetty, A. K. (2021). Extracellular vesicles for the diagnosis and treatment of Parkinson's disease. *Aging and disease*, 12(6), 1438.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654-659.
- Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., Hendrix, A. et al. (2017). EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature methods*, 14(3), 228-232.
- Welsh, J. A., Van Der Pol, E., Arkesteijn, G. J., Bremer, M., Brisson, A., Coumans, F., Jones, J. C. et al. (2020a). MIFlowCyt-EV: A framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. *Journal of extracellular vesicles*, 9(1), 1713526.
- Welsh, J. A., Horak, P., Wilkinson, J. S., Ford, V. J., Jones, J. C., Smith, D., Englyst, N. A. et al. (2020b). FCMPASS software aids extracellular vesicle light scatter standardization. *Cytometry Part A*, 97(6), 569-581.
- Willekens, F. L., Werre, J. M., Kruijt, J. K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Döpp, Y. A., van den Bos, A. G., van Berkel, T. J. et al. (2005). Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*, 105(5), 2141-2145.
- Williams, J. L., Gatson, N. N., Smith, K. M., Almad, A., McTigue, D. M., & Whitacre, C. C. (2013). Serum exosomes in pregnancy-associated immune modulation and neuroprotection during CNS autoimmunity. *Clinical Immunology*, 149(2), 236-243.
- *Willis, M. D., & Robertson, N. P. (2016). Alemtuzumab for multiple sclerosis. *Current neurology and neuroscience reports*, 16(9), 1-9.
- Wisgrill, L., Lamm, C., Hartmann, J., Preißing, F., Dragosits, K., Bee, A., Spittler, A. et al. (2016). Peripheral blood microvesicles secretion is influenced by storage time, temperature, and anticoagulants. *Cytometry Part A*, 89(7), 663-672.
- Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Ochiya, T. et al. (2014). Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nature communications*, 5(1), 1-8.

Yuana, Y., Böing, A. N., Grootemaat, A. E., van der Pol, E., Hau, C. M., Cizmar, P., Nieuwland, R. et al. (2015). Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 4(1), 29260.

Zhang, X., McGeoch, S. C., Johnstone, A. M., Holtrop, G., Sneddon, A. A., MacRury, S. M., O'Kennedy, N. et al. (2014). Platelet-derived microparticle count and surface molecule expression differ between subjects with and without type 2 diabetes, independently of obesity status. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 37(4), 455-463.

Internetové zdroje:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26617?SID=srch-hj-26617>

(* označuje přehledové články)