

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biomedicína
Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Michal Koucký

**VZTAH KONCENTRACE VYBRANÝCH MARKERŮ ZÁNĚTU A
ENDOTELOVÉ DYSFUNKCE K PŘEDČASNÉMU PORODU A FETÁLNÍMU
ZÁNĚTU**

**THE RELATIONSHIP BETWEEN SELECTED INFLAMMATION
MARKERS AND MARKERS OF THE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION TO
PRETERM LABOR AND FETAL INFLAMMATORY RESPONSE**

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce: prof.MUDr. Zdeněk Hájek, DrSc.

Konzultant: prof.MUDr.Marta Kalousová, PhD

Praha, 2011

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
1.ÚVOD	9
2.CÍLE PRÁCE	10
3.EPIDEMIOLOGIE PŘEDČASNÉHO PORODU	11
3.1.Základní mateřské epidemiologické charakteristiky	11
3.1.1.Genetická predispozice	11
3.1.2.Vzdělání a socioekonomický status	11
3.1.3.Rasové a etnické pozadí	11
3.1.4.Vliv výživy a návykových látek	12
3.1.5.Psychologické faktory	12
3.1.6.Vliv infekce a mikrobiální kolonizace porodních cest	12
3.1.7.Vliv extragenitální infekce	13
3.2.Reprodukční a gynekologická anamnéza	14
3.3.Rizikové faktory v aktuálním těhotenství	14
3.3.1.Krvácení v těhotenství	14
3.3.2.Asistovaná reprodukce	15
3.3.3.Vícečetné těhotenství	15
3.3.4.Děložní faktory	16
4.KLINICKÝ OBRAZ A DŮSLEDKY PŘEDČASNÉHO PORODU	17
4.1.Klinický obraz předčasného porodu	17
4.2.Důsledky předčasného porodu	18
5.PATOFYZIOLOGIE PŘEDČASNÉHO PORODU	19
5.1.Celkový pohled na patofyziologii předčasného porodu	19
5.2.Společná dráha předčasného a termínového porodu	20
5.2.1.Změny v kontraktilitě myometria	20
5.2.1.1.Fyziologie a patofyziologie děložní kontrakility	20
5.2.1.2.Význam progesteronu v udržení klidového děložního napětí	22
5.2.2.Remodelace děložního hrdla	23
5.2.3.Aktivace deciduy a plodových obalů	24
5.2.4.Úloha prostaglandinů	25
5.2.5.Úloha oxytocinu	26

5.2.6.Fetální osa hypotalamus – hypofýza – nadledviny	27
5.3.Zánět jako hlavní mechanismus předčasného porodu	28
5.3.1.Role zánětu v patogenezi předčasného porodu	28
5.3.2.Molekulární mechanismus aktivace zánětového procesu u předčasného porodu	31
5.3.3.Role matrixmetalloproteináz v patogenezi předčasného porodu	33
5.4.Syndrom předčasného porodu	36
5.4.1.Infekce a předčasný porod	36
5.4.1.1.Role infekce v patogenezi zánětlivého procesu předčasného porodu	36
5.4.1.2.Role cytokinů	38
5.4.1.3.Klinický obraz intraamniální infekce/zánětu	38
5.4.2.Uteroplacentární ischemie a deciduální hemorrhagie	39
5.4.3.Abnormální působení progesteronu	41
5.4.4.Porucha imunologické tolerance plodu matkou	42
5.4.5.Alergie	44
5.4.6.Nadměrné rozpětí dělohy	44
5.4.7.Inkompetence děložního hrdla	44
5.4.8.Mateřský a fetální stres	45
6.PREDIKCE PŘEDČASNÉHO PORODU A FETÁLNÍHO ZÁNĚTU	46
6.1.Predikce předčasného porodu – výsledky klinických studií	46
6.2.Predikce fetálního zánětu – výsledky klinických studií	47
7.METODIKA STUDIE	51
7.1.Hodnocení biochemických ukazatelů	51
7.2.Hodnocení histologie placenty a pupečníku	51
7.3.Statistická analýza dat	51
8.VLASTNÍ VÝSLEDKY	53
9.DISKUSE	64
10.ZÁVĚR	72
11.SUMMARY	75
12.LITERATURA	78
13.SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	96
14.PŘÍLOHY	99

14.1 Prohlášení autora	99
14.2. Identifikační záznam s abstrakty a klíčovými slovy	100
14.3. Kopie vlastních publikací v odborných časopisech	102
Low maternal serum matrix metalloproteinase (MMP)-2 concentrations are associated with preterm labor and fetal inflammatory response	103
Detection of fetomaternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study	111
Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy	117

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AGE	produkty pokročilé glykace proteinů (Advanced Glycation End Products)
ANCOVA	analýza kovariance
ATP	adenosintrifosfát
BMI	body mass index
BPD	bronchopulmonální dysplazie
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAP	s kontrakcemi spojené proteiny (Contractions Associated Proteins)
COX	cyklooxygenáza
CSF	colony stimulating factor (není český ekvivalent)
CRH	kortikotropin releasing hormon
DAMPs	s poškozením buněk/tkání spojené molekuly (Damage Associated Molecular Pattern molecules
DES	diethylstilbestrol
DHEAS	dehydroepiandrosteronsulfát
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (není český ekvivalent)
fFN	fetální fibronektin
FIRS	fetální zánětlivá odpověď (Fetal Inflammatory Response Syndrome)
FSH	folikulostimulační hormon
GnRH	gonadotropin releasing hormon
HMGB – 1	high mobility group box-1
HLA	lidský leukocytární antigen (Human Leucocyte Antigen)
ICAM-1	inter-cellular adhesion molecule 1 (není český ekvivalent)
IGF-1	insulin-like growth factor 1 (není český ekvivalent)
IGFBP-1	insulin-like growth factor binding protein-1 (není český ekvivalent)
IL-1	interleukin – 1
IL-6	interleukin – 6
IL-8	interleukin – 8
IL-10	interleukin – 10
ITP	inositoltrifosfát
IRDS	syndrom dechové tísně novorozence (Infant Respiratory Distress Syndrome)
IUGR	růstové zpomalení vývoje plodu (Intrauterine Growth Restriction)
IVH	nitrokomorové krvácení (Intraventricular Hemorrhage)

MAMPs	s mikroby spojené molekuly (Microbe-Associated Molecular Patterns)
MIAC	mikrobiální invaze do dutiny děložní (Microbial Invasion of Amniotic Cavity)
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
LH	luteotropní hormon
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
MIAC	mikrobiální invaze do dutiny děložní (Microbial Invasion of Amniotic Cavity)
MMP-2	matrixmetaloproteináza-2
MMP-8	matrixmetaloproteináza-8
MMP-9	matrixmetaloproteináza-9
MTHFR	methyltetrahydrofolátreduktáza
NEC	nekrotizující enterocolitis (Necrotising Enterocolitis)
NF- kB	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
PARs	proteázami aktivované receptory (Protease-Activated Receptors)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PDA	perzistující ductus Botalli (Persisting Ductus Arteriosus)
PGE2	prostaglandin E2
PGDH	prostaglandindehydrogenáza
PGF2alfa	prostaglandin F2alfa
PGH2	prostaglandin H2
PGHS	prostaglandinsyntetáza
PGI2	prostacyklin I2
PLA2	fosfolipáza A2
PPROM	předčasný odtok plodové vody (Preterm Premature Rupture Of Membranes)
PR	progesteronový receptor
PRR	pattern recognition receptor (není český ekvivalent)
PVL	periventrikulární leukomalacie
RAGE	receptor pro produkty pokročilé glykace proteinů (Receptor For Advanced Glycation End Products)
ROC	receiver operating characteristic (není český ekvivalent)
ROP	retinopatie nedonošených (Retinopathy of Prematurity)
SD	standardní odchylka
SIRS	systémová zánětlivá reakce (Systemic Inflammatory Response)
sRAGE	solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace proteinů (Receptor For

Advanced Glycation End Products)

5-THF	5-methyltetrahydrofolát
TGF	transformující růstový faktor (Transforming Growth Factor)
TIMP	tkáňový inhibitor matrixmetalloproteináz
TLR	toll like receptor (není český ekvivalent)
TNF-alfa	tumor nekrotizující faktor alfa
TPO	tyroidperoxidáza
TRAK	protilátky pro tyreotropnímu receptoru (For Thyrotropin Receptor Antibodies)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 (není český ekvivalent)

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci doktorského studijního programu v biomedicině na Gynekologicko – porodnické klinice 1.lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Poděkování patří především mému školiteli prof.MUDr. Z.Hájkovi, DrSc. za odborné vedení studia a všestrannou podporu a pomoc při vypracování dizertační práce. Dále bych chtěl poděkovat konzultantce prof. MUDr. M. Kalousové, PhD za odborné rady týkající se vlastního výzkumného projektu i za podporu, kterou vytvořilo celé její pracoviště - Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1.LF UK - k provedení laboratorních vyšetření. Také bych chtěl poděkovat prof.MUDr.A.Martanovi, DrSc., který mi jako přednosta Gynekologicko – porodnické kliniky 1.LF UK a VFN vytvořil vynikající podmínky k postgraduálnímu studiu a k mé práci a také všem kolegům z Gynekologicko – porodnické kliniky , kteří mi předávali své cenné zkušenosti v oblasti klinické a výzkumné.

1. ÚVOD

Předčasný porod je definován jako porod před dokončeným 37.týdnem těhotenství. Stanovení dolní hranice prematurity je poněkud komplikované, jednotlivé státy mají nastavenou hranici „životaschopnosti“ plodu různě. Její určení je předmětem debat, pro většinu světových odborných společností (včetně České gynekologicko-porodnické i České neonatologické společnosti) je touto hranicí 24.gestační týden. Předčasný porod představuje závažný socioekonomický problém, jak vzhledem k významným nákladům na péči, tak i stran začlenění některých předčasně narozených handicapovaných dětí do společnosti. Z formálních důvodů je vhodné rozdělit skupinu pacientek s předčasným porodem na dvě podskupiny. První podskupinu představují předčasné porody „indikované“ . V těchto případech je těhotenství předčasně ukončováno pro závažné komplikace na straně matky, plodu či obou, v naprosté většině případů císařským řezem. Nejčastější důvod k ukončení těhotenství na straně matky představuje preeklampsie, na straně plodu pak intrauterinní růstová restrikce plodu (IUGR) . Druhá podskupina zahrnuje ženy se spontánním předčasným porodem. Problematice spontánního předčasného porodu je věnován obsah dizertační práce .

Základním patogenetickým procesem spontánního předčasného porodu je zánět. Předčasný porod představuje multifaktoriální proces, který se týká matky i plodu. Je-li přítomna zánětlivá odpověď plodu, zvyšuje se riziko následné postnatální morbidit dětí i jejich dlouhodobého handicapu. Incidence předčasných porodů zůstává během posledních 10 let v České republice na přibližně stejné úrovni (7-8 %) . Současný výzkum v této oblasti je zaměřen na včasné odhalení předčasného porodu a fetální zánětlivé odpovědi. Ještě do 90.let minulého století nebyla k dispozici ucelená představa o příčinách spontánního předčasného porodu. Jeho riziko bylo hodnoceno především na podkladě relativně nespecifických epidemiologických faktorů na straně matky. Tyto rizikové faktory hrají nadále důležitou roli, nicméně s výzkumem v této oblasti došlo k obrovskému pokroku v chápání patofyziologie předčasného porodu. Probíhá intenzivní studium biochemických markerů předčasného porodu i zánětlivé odpovědi plodu. Narůstající objem informací o patofyziologických mechanismech předčasného porodu umožňuje začlenit do jeho managementu nové diagnostické a terapeutické postupy.

2. CÍLE PRÁCE

- popsat patofyziologické změny, ke kterým dochází u předčasného porodu a objasnit úlohu zánětu v jeho patogenezi
- popsat úlohu jednotlivých spouštěcích mechanismů předčasného porodu
- popsat vztah koncentrace vybraných markerů zánětu a endotelové dysfunkce v mateřské a pupečnickové krvi k předčasnému porodu a fetálnímu zánětu

3. EPIDEMIOLOGIE PŘEDČASNÉHO PORODU

Spontánní předčasný porod má celou řadu rizikových faktorů, které lze rozdělit do tří skupin. První zahrnuje základní mateřské epidemiologické charakteristiky, jako jsou genetická predispozice, rasa, vzdělání, socioekonomický status, abus, výživové zvyklosti a infekce v porodních cestách. Druhou skupinu představuje reprodukční anamnéza, tj. především anamnéza předchozího předčasného porodu, vrozené vady dělohy, zákroky na děložním hrdle. Třetí skupinu tvoří skupina rizikových faktorů, které se nově objevují v aktuálním těhotenství.

3.1. Základní mateřské epidemiologické charakteristiky

3.1.1. Genetická predispozice

Genetická predispozice k předčasnému porodu je již delší dobu studována a bylo provedeno několik studií, které uvedený vztah prokazují. Ženy, jejichž sestry porodily předčasně, mají 1,8 krát větší riziko předčasného porodu (Winkvist et al., 1998). Další práce prokázaly souvislost polymorfismu některých genů se spontánním předčasným porodem (Engel et al., 2005). Významná byla především studie Romera, která se zabývala vztahem polymorfismu genu pro další důležitý cytokin zánětu - TNF-alfa - a výskytem bakteriální vaginózy k předčasnému porodu. Práce prokázala, že ženy s mutací genu pro TNF-alfa (alela 2) a současně se vyskytující bakteriální vaginózou mají 10x vyšší riziko předčasného porodu než ženy s bakteriální vaginózou bez výše uvedené mutace (Romero, Chaiworapongsa et al., 2004). Především tato studie podporuje význam interakce genů a prostředí v patogenezi předčasného porodu.

3.1.2. Vzdělání a socioekonomický status

Nízký socioekonomický status, nižší vzdělání, věk pod 20 let a nad 35 let, absence partnera, to vše jsou rizikové faktory, které zvyšují pravděpodobnost předčasného porodu. Naopak, s vyšším vzděláním riziko předčasného porodu klesá (Smith et al., 2007, Thompson et al., 2006). Přesné souvislosti ale nejsou známy.

3.1.3. Rasové a etnické pozadí

K předčasnému porodu dochází v USA a Velké Británii téměř dvakrát častěji u černé afroamerické a afro-karibské rasy než u asiátů, hispánců a kavkazské bílé rasy (Hamilton et al., 2005).

3.1.4. Vliv výživy a návykových látek

Riziko předčasného porodu stoupá s nízkým body mass indexem (BMI) – je-li méně jak 19, zatímco mateřská obezita (BMI více jak 30) může být protektivním faktorem (Hendler et al., 2005) . Další práce hodnotí vztah koncentrace folátů, železa a zinku v séru těhotných k předčasnému porodu. Ve skupině žen s nízkými sérovými hladinami uvedených minerálů a vitamínu je pozorován vyšší výskyt předčasného porodu než u těhotných s normálními hladinami uvedených parametrů. Mechanismus, jakým způsobem výživový status ovlivňuje předčasný porod, není zcela jasný. Možnou příčinou je nižší odolnost proti infekci (Neggers et al., 2003) .

Kouření cigaret v těhotenství je spojeno s řadou komplikací , jako jsou např. intrauterinní růstová restrikce plodu (IUGR), předčasné odlučování placenty, hypoxie plodu během porodu apod. Souvislost se spontánním předčasným porodem je však poměrně malá . Populační studie na více než 300 000 těhotných s jednočetným těhotenství ukázala, že kouření více jak 10 cigaret denně zvyšuje riziko předčasného porodu přibližně 1,7 krát. Není přesně známo, jakým mechanismem kouření ovlivňuje riziko předčasného porodu, jedním z možných mechanismů může být vazokonstrikční působení nikotinu ve vdechovaném kouři (Kyrklund-Blomberg et al.,1998) . Uteroplacentární ischémie (vznikající v důsledku vasokonstrikce na úrovni placenty) je pak jedním z možných spouštěcích mechanismů předčasného porodu (viz kapitola 5.4.2) . Zároveň není překvapující, že ve skupině těhotných kuřáček nalézáme častěji děti s nižší porodní hmotností (Cnattingius, 2004) .

Užívání měkkých či tvrdých drog není, přes původní zprávy, prokazatelně spojeno s rizikem předčasného porodu, totéž platí pro nadměrný abuzus alkoholu (Albertsen et al., 2004) .

3.1.5. Psychologické faktory

Stres během těhotenství představuje značně nespécifickou skupinu různých osobních či socioekonomických problémů, jako jsou ztráta člena rodiny, rozvod, ztráta zaměstnání apod. Práce, které se zabývaly významem výše uvedených faktorů, ukázaly mírně vyšší riziko předčasného porodu (Ruiz et al., 2003, Kiecolt-Glaser et al., 2002) . Výsledky některých studií nasvědčují tomu, že zejména chronický stres může oslabit fungování imunitního systému, což může dále vést k poruše rovnováhy tolerance plodu matkou či k vyšší vnímavosti k infekci (Annelis et al., 2004) . (viz kapitola 5.4.4)

3.1.6. Vliv infekce a mikrobiální kolonizace porodních cest

V současné době jsou k dispozici důkazy o zřejmém vztahu extragenitálních infekcí v těhotenství a předčasného porodu (viz kapitola níže) . Komplikovanější oblast představuje vztah

kolonizace a infekce porodních cest k předčasnému porodu. Kolonizace představuje, na rozdíl od infekce, pouhé osídlení mikroby, infekce již zánětlivou odezvou tkání na přítomnost mikroorganismů. Pozornost je stoupající měrou věnována prekoncepční kolonizaci porodních cest a její úloze v patogenezi předčasného porodu. Je pravděpodobné, že prostý výskyt mikrobů v porodních cestách sám o sobě nemusí spustit předčasný porod, je nutná příslušná genetická dispozice. Jednou z prací, která uvedenou skutečnost dokládá, je výše uvedená práce Romera. (viz kapitola 3.1.1) Na druhou stranu, souvislost mezi infekcí v porodních cestách a předčasným porodem je poměrně dlouho známa (Knox et al., 1950). Ať už se jedná o kolonizaci či infekci, představuje nejvýznamnější etiologická agens skupina genitálních mykoplasmat, především *Ureaplasma urealyticum* a *Mycoplasma hominis*. Mezi další mikroorganismy patří *Streptococcus agalactiae*, *Trichomonas vaginalis* a *Chlamydia trachomatis*. Samostatně stojící skupinu představuje bakteriální vaginóza. Pojem bakteriální vaginóza zahrnuje narušení normální poševní mikroflory, tato diagnóza není chápána jako infekce. V poševním prostředí za fyziologických podmínek dominuje acidofilní bakterie - *Lactobacillus acidophilus*. Tento mikrob se podílí na bariérové funkci porodních cest. Tvorbou laktátu zajišťuje nízké pH poševního prostředí a vytváří tak přirozenou ochranu proti infekci. Bakteriální vaginóza je charakterizována poklesem počtu přirozených aerobních *Lactobacillů*, vzestupem počtu anaerobních (tzv. vláknitých) *Lactobacillů*, *Gardnerel* a *Mykoplasmat* a převážně anaerobních bakterií, jako jsou kmeny *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* a *Mobiluncus*. V nativním stěru z pochvy chybí leukocyty, jsou přítomny četné bakterie a tzv. klíčové buňky (angl. clue cells = buňky poševní sliznice, které jsou pokryty bakteriemi, což jim pod mikroskopem dává "zrnitý" vzhled). Jedná se tedy o polymikrobiální stav, při kterém se zvyšuje poševní pH, klesá počet *Lactobacillů* a 100 i vícenásobně se zvyšuje koncentrace jiných mikroorganismů (Nugent et al., 1991). Bakteriální vaginóza je v současnosti chápána jako jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů předčasného porodu, souvislosti jsou dlouhodobě známy. Bohužel však dosud není k dispozici žádný důkaz o tom, že by cílená léčebná úprava této poševní dysmikrobie snížila pravděpodobnost předčasného porodu (McDonald et al., 2007, Okun et al., 2005) . Výskyt typických sexuálně přenosných infekcí, jako jsou *Chlamydia trachomatis*, kapavka a syfilis zvyšuje riziko předčasného porodu dvojnásobně, ale ani zde příslušná léčba riziko předčasného porodu nesnižuje (Donders et al., 1993). Podrobnosti o úloze infekce v patofyziologii předčasného porodu jsou uvedeny v kapitole 5.4.1.

3.1.7. Vliv extragenitální infekce

Extragenitální infekce, zejména pyelonefritis, asymptomatická bakteriurie, pneumonie a appendicitis jsou spojeny s rizikem předčasného porodu (Goldenberg et al., 2005, Romero et al.,

1989) . Některé práce dále poukazují na možnou souvislost předčasného porodu a zánětu měkkých tkání kolem zubů – periodontitis (Offenbacher et al., 2006). Nejčastěji diskutovaným mechanismem, který by vysvětloval vztah extragenitálních infekcí k předčasnému porodu, je hematogenní způsob šíření mikroorganismů do porodních cest. Ale přesné vysvětlení, jakým způsobem mohou bakterie mimo genitální trakt spustit předčasný porod, dosud není známo.

3.2. Reprodukční a gynekologická anamnéza

Přestože většina žen, které mají zkušenost s předčasným porodem, porodí další dítě v termínu, je riziko opakování předčasného porodu přibližně dvojnásobné, a to nezávisle na rase (Mercer et al., 1999) . Riziko dále stoupá nepřímo úměrně tím, čím dříve předchází předčasný porod proběhl. Vyšší riziko lze očekávat, porodila – li žena předchází dítě před 32.týdnem těhotenství (Behrman et al., 2007). Zvýšený výskyt předčasného porodu nalézáme i ve skupině žen s vrozenými vadami dělohy. Předpokládaným mechanismem bude nejspíše nadměrné rozpětí myometria (Lin, 2004) . (viz kapitola 6.4.6) Anamnéza předcházejícího přerušení těhotenství, ať už z důvodu nechtěné gravidity (interrupce), vrozené vady plodu či jiných příčin, zvyšuje také riziko předčasného porodu v následném těhotenství. Jeho pravděpodobnost stoupá s počty výkonů (Ancel et al., 2004, Moreau et al., 2005). V neposlední řadě je potřeba zmínit vyšší pravděpodobnost předčasného porodu u žen, které podstoupily před těhotenstvím chirurgické ošetření děložního hrdla v rámci managementu jeho prekanceróz. Největší studie posuzující spojitost předchozí konizace hrdla děložního a předčasného porodu pocházejí ze Skandinávie. V prospektivních „follow up“ pracech Jakobsona a Nøhra bylo shodně zaznamenáno přibližně dvojnásobné riziko předčasného porodu před 32.týdnem těhotenství u žen, které prodělaly před těhotenstvím uvedený zákrok (Jakobsson et al., 2007, Nøhr et al., 2007). Předpokládaným mechanismem je porušení uzávěrového aparátu děložního hrdla. Při umělém přerušení těhotenství je obvyklé použití nástrojů rozšiřující cervikální kanál, konizace může zasáhnout stroma děložního hrdla. Oba typy výkonů tak mohou v děložním hrdle poranit anatomické struktury zodpovědné za udržení těhotenství. (viz kapitola 5.4.7)

3.3. Rizikové faktory v aktuálním těhotenství

3.3.1. Krvácení v těhotenství

Krvácení v těhotenství způsobené přítomností vcestné placenty či odlučováním i normálně uložené placenty vede relativně často k indikovanému (operačnímu) předčasnému porodu ze sdružené indikace matky a plodu. Jinou kapitolu ale představuje krvácení z rodidel (z dělohy) v

I.a II.trimestru. Není – li znám jeho přesný původ, je významně často spojeno s následným předčasným porodem, obzvláště, je-li krvácení rekurentního či intermitentního přetrvávajícího charakteru (Yang et al., 2004). Jen krvácení v I.trimestru zvyšuje riziko následného předčasného porodu zhruba dvojnásobně (Williams et al., 1991, Harger et al., 1990) . Podrobnosti o vztahu krvácení k patofyziologii předčasného porodu jsou dále uvedeny v kapitole 5.4.2.

3.3.2. Asistovaná reprodukce

S předčasným porodem se setkáváme častěji u žen, které otěhotněly po umělém vyvolání ovulace a některé z technik asistované reprodukce, a to nezávisle na četnosti těhotenství či jiných vlivech. Asistovanou reprodukcí se rozumí skupina postupů, které jsou zakončeny „in vitro fertilizací“ a následně transferem embrya do dělohy (včetně kryoembryotransferu – přenos „rozmražených“ embryí uchovaných z předchozího cyklu „in vitro fertilizace“) (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2005) . Data, která jsou k dispozici u jedno- a dvojčetných gravidit, jsou poměrně robustní. Ve srovnání s těhotenstvími po spontánním početí je u těhotenství po asistované reprodukci patrné přibližně trojnásobně větší riziko předčasného porodu. Uvedené informace představují závěr metaanalýzy 27 studií (Helmerhorst et al., 2004). Vyvolání ovulace není metodou asistované reprodukce, protože do mechanismu fertilizace nezasahuje. Clomifencitrát je preparát, který má estrogení a antiestrogení účinek. Důležitý je jeho efekt antiestrogení. Obsazením estrogenových receptorů v hypotalamu tlumí zpětnou regulaci .Po 5-ti denním užívání clomifencitrát se s jeho vysazením zvyšuje produkce GnRH – gonadotropin relasing hormonu, a dále i gonadotropních hormonů (FSH, LH). Ovaria pak vytváří více zralých folikulů. Donedávna byla indukce ovulace spojována především s vyšším výskytem vícečetných těhotenství, nebyl popisována vyšší incidence předčasného porodu. Kohortová studie Ombeleta však na souboru více jak 12 000 žen po indukci ovulace ukázala trojnásobně vyšší riziko předčasného porodu před 32.týdnem těhotenství proti skupině žen po spontánním početí (Ombelet et al., 2006).

3.3.3. Vícečetné těhotenství

Vícečetné těhotenství s sebou nese šestinásobně vyšší riziko předčasného porodu ve srovnání s jednočetným těhotenstvím. Pravděpodobnost narůstá s počtem plodů. Více jak 60% dvojčat se rodí předčasně, nejčastěji je prvním projevem předčasného porodu předčasný odtok plodové vody – PPRM. Důvodem může být nadměrné rozpětí dělohy, ale tento mechanismus samostatně nepředstavuje uspokojivé vysvětlení, proč u vícečetných těhotenství dochází častěji k předčasnému porodu, vzhledem k tomu, že přibližně zbývajících 40% těhotných s dvojčaty porodí

až po 37.týdnu těhotenství. Uvedené informace opět podporují multifaktoriální etiologii předčasného porodu (Goldenberg et al., 1996, Newman et al., 2006) . Poměrně překvapivou informací představuje že zjištění, že je výskyt předčasného porodu u žen s vícečetným těhotenstvím přibližně stejný jak ve skupině žen po spontánním početí , tak ve skupině po asistované reprodukci (Sciscione et al, 2008).

3.3.4. Děložní faktory

Zvýšený objem dělohy, způsobený nadměrným množstvím plodové vody (ale i vícečetným těhotenstvím) s sebou nese přibližně šestinásobně vyšší riziko předčasného porodu (Meis et al., 1995) . Dalším faktorem, který ovlivňuje výskyt předčasného porodu, je stav děložního hrdla. V dalším textu je podrobně popsáno, k jakým změnám dochází přirozeně během každého těhotenství (viz kapitola 5.2.2) . Za patologických podmínek hovoříme o inkompetenci – nedostatečnosti uzávěrového aparátu - děložního hrdla. (viz kapitola 5.4.7) Palpační vyšetření děložního hrdla při běžném gynekologickém vyšetření lékařem bylo dříve tradičně považováno za základní způsob hodnocení rizika předčasného porodu. Již od 90.let minulého století jsou ale k dispozici údaje, které ukazují podstatně lepší predikci předčasného porodu pomocí ultrazvukového měření délky děložního hrdla vaginální ultrazvukovou sondou – cervikometrií (Andersen et al., 1990, Iams et al., 1996, Taipale et al., 1998, Heath et al., 1998) . O ultrazvukové cervikometrii a její úloze v klinické praxi je pojednáno v kapitole 6.

4. KLINICKÝ OBRAZ A DŮSLEDKY PŘEDČASNÉHO PORODU

4.1. Klinický obraz předčasného porodu

Předčasný porod představuje multifaktoriální proces, který může být spojen s různými medicínskými souvislostmi. V současném porodnictví si pod pojmem „předčasný porod“ většina odborníků představuje především spontánní předčasný porod. Jak je již ale řečeno v úvodu, je vhodné skupinu pacientek s předčasným porodem rozdělit na podskupinu s jmenovaným spontánním předčasným porodem a podskupinu pacientek s indikovaným předčasným porodem. Dizertační práce se věnuje problematice spontánního předčasného porodu, nicméně pro úplnost je nutné uvést i základní informace o indikovaném předčasném porodu. Indikovaný předčasný porod zahrnuje z celkového počtu přibližně 25% žen. Hlavními důvody k předčasnému ukončení těhotenství představují různé situace, které s sebou nesou ohrožení matky (především závažné mateřské onemocnění), plodu (např. intrauterinní růstová restrikce plodu, hypoxie plodu) či obou (např. předčasné odlučování placenty) (Meis et al., 1995, Meis et al., 1998). Spontánní předčasný porod představuje z celkového počtu přibližně 75% případů. V literatuře bylo dosud publikováno mnoho schémat, jak co nejvíce zjednodušit názvosloví klinického obrazu spontánního předčasného porodu. Většina autorů se nyní shoduje, že spontánní předčasný porod s sebou nese tři základní formy klinického obrazu: předčasný porod s kontrakcemi (3 a více kontrakcí do hodiny), předčasný odtok plodové vody – PPRM (Preterm Premature Rupture of Membranes) a inkompetenci děložního hrdla. Klinický obraz dále modifikuje ve všech uvedených případech několik dalších faktorů, především četnost těhotenství, krvácení z rodidel a přítomnost infekce (Annath et al., 2006).

4.2. Důsledky předčasného porodu

Pro objektivní hodnocení výsledku péče o ženy s předčasným porodem a následně o předčasně rozené děti používáme především stanovení perinatální mortality a morbidity. Další výstup péče představuje hodnocení přítomnosti dlouhodobého zdravotního postižení, které souvisí s nezralostí a jejími komplikacemi. Perinatální mortalita představuje součet počtu živě rozených dětí zemřelých do 7.dne po porodu a mrtvě rozených dětí na 1000 živě rozených novorozenců. Perinatální morbidita zahrnuje několik diagnóz a souvisí nejen s vlastní nezralostí, ale i s etiopatogenetickými okolnostmi předčasného porodu, především s fetální zánětlivou odpovědí. (viz dále kapitola 5.4.1) Nejvýznamnější diagnózami jsou především syndrom dechové tísně novorozence (infant respiratory distress syndrome - IRDS), krvácení do mozkových komor (intraventricular hemorrhage – IVH), bronchopulmonální dysplazie (BPD), perzistující ductus

arteriosus Botalli (PDA) , nekrotizující enterokolitis (NEC) , sepsa a retinopatie nedonošených (ROP). Další patofyziologický projev, který je zodpovědný za následné neurologické komplikace (především dětskou mozkovou obrnu) , představuje periventrikulární leukomalacie (PVL) . S největší pravděpodobností se jedná o důsledek poškození bílé hmoty mozkové prozánětlivými cytokiny. Nejvýznamnějším předporodním prognostickým ukazatelem perinatální morbidity i mortality je týden těhotenství, ve kterém spontánní předčasný porod proběhl. Platí přitom nepřímá úměra, čím nižší týden předčasného porodu, tím větší pravděpodobnost uvedených komplikací (Vohr et al., 2004). Přestože mortalita i morbidita dětí významně klesá po 32.týdnu těhotenství, ještě do 36.týdne těhotenství není výskyt morbidity zanedbatelný (McIntire et al., 2008). Celoživotní zdravotní postižení , které je důsledkem morbidity spojené s předčasným porodem, zahrnuje především chronickou plicní nemoc, poruchy zraku a sluchu, dětskou mozkovou obrnu a poruchy psychomotorického vývoje (Wood et al., 2000, Hack et al., 2002). Na straně matek jsou komplikace spontánního předčasného porodu poměrně málo časté, nejčastěji se jedná o poporodní zánět dělohy a infekce močových cest. Septické komplikace matky jsou vzácné.

5. PATOFYZIOLOGIE PŘEDČASNÉHO PORODU

5.1. Celkový pohled na patofyziologii předčasného porodu

Problematika patofyziologie předčasného porodu představuje velmi komplikovanou oblast a náhled na ní se neustále vyvíjí. V odborném písemnictví jsou předčasný porod i porod v termínu považovány za stejný proces, ačkoliv se oba vyskytují v rozdílných gestačních obdobích. U obou typů porodů probíhají stejné pochody na úrovni dělohy, především zvýšená kontraktilita myometria, zrání děložního hrdla a aktivace deciduy a plodových obalů. Nejvýznamnější rozdíl mezi předčasným porodem a porodem v termínu představuje jejich odlišná aktivace. Zatímco u termínového porodu dochází k fyziologické aktivaci procesu, předčasný porod je výsledkem aktivace patologické. V současné době máme jen omezenou představu o způsobu zahájení fyziologického porodu u lidí. Předpokládáme, že se jedná o komplexní proces, ve kterém plod a matka vzájemně „kooperují“. Neméně významnou roli hrají placenta a plodové obaly. Dostupné údaje z pokusů na zvířatech ukazují, že primárním impulsem k počátku fyziologického porodu je spuštění fetální hypotalamo-hypofyzární osy, na jejímž konci stojí stimulace syntézy steroidů, tyto dále zvyšují produkci prostaglandinů (Liggins et al., 1994, Flint et al., 1975). V etiopatogenezi (aktivaci) předčasného porodu se uplatňuje více příčin, předpokládáme, že se mohou vzájemně kombinovat. V literatuře se o předčasném porodu diskutuje jako o syndromu (Romero et al., 2004). Byly publikovány četné práce, ve kterých byly předloženy důkazy o vztahu níže uvedených mechanismů k spuštění předčasnému porodu:

- infekce
- uteroplacentární ischemie a deciduální hemorrhagie
- porucha imunologické tolerance plodu matkou („fetus as an allograft“)
- alergie
- nadměrné rozpětí dělohy
- inkompetence děložního hrdla
- abnormální působení progesteronu
- mateřský a fetální stres

Po aktivaci předčasného i termínového porodu tedy následuje společná dráha, která s sebou nese anatomické, biochemické, imunologické, endokrinologické a klinické jevy, tyto se vykytují na straně matky a plodu. Větší důraz je přitom dáván na biochemické a klinické změny, které probíhají děloze, neméně důležitý je význam i systémových endokrinních změn, především změn hladin kortikotropin-releasing hormonu (CRH).

5.2. Společná dráha předčasného i termínového porodu

Jak již bylo uvedeno, předčasný i termínový porod s sebou nese společnou (pato)fyziologickou dráhu, oba typy porodů liší se pouze způsobem její aktivace. Tato společná dráha zahrnuje především pochody na úrovni dělohy, tj. změny kontraktility myometria, zrání/remodelaci děložního hrdla a aktivaci deciduy a plodových obalů. Schéma patofyziologie předčasného porodu je v přehledu zobrazeno na konci kapitoly 5 (Obrázek 1). Všechny uvedené změny zprostředkovávají prostaglandiny. Aktivace jednotlivých komponent společné dráhy může probíhat synchronně či asynchronně. Pro spontánní předčasný porod je spíše typická asynchronní aktivace jednotlivých komponent, což může vést k odlišnému klinickému obrazu, např. izolovaná aktivace deciduy a plodových obalů vede k předčasnému odtoku plodové vody - PPRM . Pro termínový spontánní porod je naopak obvyklé souběžné spuštění jednotlivých pochodů. U všech uvedených součástí společné dráhy existují důkazy o zapojení systémů realizujících zánětovou odpověď organismu, a to nezávisle na tom, jestli se jedná o termínový či předčasný porod (Haddad et al., 2006, Romero et al. , 2002). V následujícím textu objasním, jaké jsou dostupné údaje o účasti zánětu na úrovni jednotlivých komponent společné dráhy termínového a předčasného porodu. V další části dále uvedu, jaké jsou v současné době k dispozici literární informace o způsobech aktivace zánětlivého procesu u předčasného porodu. (viz kapitola 5.3)

5.2.1. Změny v kontraktilitě myometria

5.2.1.1. Fyziologie a patofyziologie děložní kontraktility

Děloha patří mezi orgány složené z hladké svaloviny, pro její fyziologii platí obdobná pravidla jako pro ostatní lidské orgány stejného složení . Přesto mají některé biochemické pochody v ní probíhající specifické rysy. Abychom mohli pochopit patofyziologické procesy, je nejprve nutné připomenout základní rysy její fyziologie. Podstatou její funkce je kontrakce, která vzniká interakcí aktinu a myosinu – proteinů svalových buněk – myocytů . Jednotlivé myocyty jsou propojeny pomocí gap a tight junctions, čímž dochází ke koordinaci a synchronizaci kontrakcí v rámci celé dělohy. Klíčovým procesem interakce aktinu a myosinu je fosforylace myosinu pomocí myosinkinázy. Pro aktivaci myosinkinázy je nezbytný komplex calmodulin a ionty vápníku. Homeostáza vápenatých iontů má klíčovou úlohu v aktivitě myocytů. Intracelulární hladiny vápníku jsou regulovány dvěma mechanismy : influxem buněčnou membránou a uvolňováním ze zásobních míst myocytů (sarkoplazmatické retikulum). Ionty vápníku vstupují do buněk nejméně dvěma cestami : napětově závislými – pomocí depolarizace buněčné membrány a napětově nezávislými kanály – stimulací receptorů příslušnými agonisty či blokadou antagonisty.

Receptory jsou na membránách vytvářeny působením ovariálních a placentárních steroidů . Působením progesteronu dochází k vytváření receptorů 2.typu = beta-adrenergní receptory. Působením estradiolu se tvoří receptory 1.typu = alfa-adrenergní, muskarinergní, cholinergní , oxytocinové, prostaglandinové. Vstup kalcia do buněk je stimulován agonisty receptorů 1.typu. Po kontrakci následuje návrat iontů vápníku proti koncentračnímu spádu do původních stanovišť za pomoci ATP pumpy. Návrat kalcia je stimulován agonisty receptorů 2.typu – beta-mimetiky a magnesiem . Důležitá je také regulace myosinkinázy pomocí cAMP (cyklického adenosinmonofosfátu), který inhibuje její funkci. Hladiny cAMP jsou zvyšovány stimulací beta-adrenergních receptorů 1.typu, tedy např. beta-mimetiky. Na množství receptorů a koncentraci příslušných agonistů a antagonistů závisí přesun iontů vápníku do cytoplazmy a z ní a tím aktivace a relaxace kontraktálního systému (Graham et al, 1997) .

Děložní kontraktilita se v průběhu těhotenství a s nástupem porodu neustále vyvíjí. Obecně lze rozdělit období těhotenství z hlediska změn kontraktility myometria na tři fáze, které nejsou zcela ostře ohraničené. První fázi představuje klidové těhotenské období (angl. uterine quiescence), kdy převažuje děložní aktivita, která s sebou nese minimální klinické projevy. Tyto těhotné nejčastěji vnímají jako „tvrdnutí“ či ojedinělé bolesti břicha. Druhé, přípravné, období (narůstající mezibuněčná komunikace) začíná řádově dny před porodem , třetí pak představuje vlastní porod. Přestože se děložní kontrakce objevují po celé těhotenství (a i mimo těhotenství) , porod je charakterizován dramatickými změnami v jejích vzorci . Postupně dochází k vývoji od „kontraktur“ ke kontrakcím. Někteří autoři (Nathanielsz et al. 1992 , Hsu et al., 1989) definují „kontraktury“ jako epizody děložní aktivity trvající několik minut, vzniká při nich jen mírné zvýšení intrauterinního tlaku a na elektromyogramu jsou zaznamenány ojedinělé salvy elektrické aktivity. Naproti tomu kontrakce s sebou nesou významné změny intrauterinního tlaku a elektromyografické aktivity. Změna vzorce děložní aktivity z období „kontraktur“ do fáze kontrakcí nastává fyziologicky v době termínové porodu . Za patologických podmínek, v rámci předčasného porodu, jsou popsány uvedené změny při infekci a při intraabdominální chirurgii v těhotenství (Nathanielsz et al., 1987, Romero et al., 1993). Z pohledu molekulární biologie lze říci, že po klidovém těhotenském období, ve kterém převažuje inhibice děložní aktivity (převaha „kontraktur“, tlumivý efekt progesteronu, viz následující kapitola), dochází v těsně před porodem a v jeho úvodu k expresi tzv. CAP genů (contraction-associated protein), nezbytných pro vývoj děložní kontraktility. Expresí CAP genů je produkován důležitý protein – Connexin-43 – hlavní „stavební kámen“ gap junctions a receptorů. Podílí se i na struktuře iontových kanálů. Nejvýznamnější látky , které se diskutují v souvislosti s regulací exprese CAP-genů a formování gap junctions , představují prostaglandiny a estrogény (Cook et al., 2000). Narůstající

komunikace mezi svalovými buňkami dělohy je zodpovědná za efektivitu děložní aktivity během porodu. Počet gap junctions rychle stoupá těsně před porodem a stejně tak se snižuje po porodu. Formace gap junctions a exprese hlavního proteinu těchto spojení - Connexinu-43 – probíhá v lidském myometriu shodně u termínového a předčasného porodu. Pakliže nárůst exprese genů pro Connexin-43 a formace gap junctions předchází porodu, lze předpokládat, že se uvedený proces podílí na změně vzorce děložní činnosti z „kontraktur“ na kontrakce před začátkem porodu (Balducci et al., 1993, Lefebvre et al., 1995). Experimenty na genetické úrovni (microarray vzorků myometria odebraných v průběhu termínového i předčasného porodu) ukazují silnou expresi genů (především genů pro interleukin – 8 a superoxid dismutasu) podílejících se na kontrole a průběhu zánětu (Chan et al., 2002, Romero, Lockwood, 2009). Závěry uvedených prací podporují účast zánětlivého mechanismu na změnách kontraktility myometria i v průběhu termínového porodu. V případě patologické aktivace (nejčastěji infekcí) může dojít ke změně vzorce děložní činnosti časněji i rychleji (Lye et al., 2004).

Zásadní roli v udržení klidového děložního napětí hraje progesteron. (viz dále kapitola 5.2.1.2)

Dalším mechanismem ovlivnění klidového napětí děložní svaloviny je zvyšování hladiny intracelulárního cAMP, který jednak inhibuje uvolňování iontů vápníku z intracelulárních zásob, jednak inhibuje myosinkinázu, jak je již uvedeno výše (Ni et al., 2004). Po výše uvedené přípravné fázi, která je charakterizovaná narůstající mezibuněčnou komunikací, je v rámci probíhající první a druhé doby porodní myometrium stimulováno různými látkami – uterotoniky – oxytocinem, prostaglandiny a pravděpodobně též CRH. Po vypuzení plodu a placenty je děloha stimulována především oxytocinem.

5.2.1.2. Význam progesteronu v udržení klidového děložního napětí

Progesteron je steroidní hormon, který hraje zásadní roli po celou dobu těhotenství. Působí prostřednictvím svých intracelulárně uložených receptorů. Progesteronové receptory (PR) patří mezi superrodinu ligandem aktivovaných regulátorů transkripce. Na počátku těhotenství je progesteron produkován žlutým tělískem, po 12.gestačním týdnu je již tvořen placentou. Jeho význam je v počátku těhotenství zřejmý. Chirurgické odstranění žlutého tělíska nebo podání antagonistů PR vede v I.trimestru k potratu (Csapo et al., 1978, Peyron et al., 1993). V dalším průběhu těhotenství, od II.trimestru dále, jsou detaily o jeho působení méně jasné. U většiny zvířat je porod spojen s poklesem hladiny progesteronu, u lidí jsou však jeho hladiny stejné ještě řádově týdny před porodem a během porodu, až do porodu placenty. Uvedené informace naznačují, že systémový pokles hladiny progesteronu u lidí není nezbytný pro počátek termínového i předčasného porodu. Naopak přibývají důkazy, že je počátek porodu spojen se sníženým působením

progesteronu pouze v cílovém orgánu – na úrovni dělohy (Challis et al., 2000). Například podání antagonisty progesteronových receptorů mifepristonu (RU 486) vede ke zvýšení děložní aktivity a zraní děložního hrdla (Neilson, 2000) . Obecný předpoklad působení progesteronu je takový, že se podílí na udržení klidového napětí děložní svaloviny snížením produkce prostaglandinů a inhibicí exprese CAP-genů v myometriu (Norwitz et al., 1999) . Molekulární mechanismus, jakým progesteron ovlivňuje klidové napětí děložní svaloviny v průběhu těhotenství , ale dosud není přesně znám. V současné literatuře jsou uváděny nejméně dvě možné cesty jeho působení. Progesteronové receptory se vyskytují v lidských tkáních nejméně ve dvou isoformách – PR-A a PR-B. Obě isoformy se sice strukturálně liší velmi málo, ale mají diametrálně odlišné funkce. Zatímco PR-B je aktivátor genů „vnímavých“ k progesteronu , PR-A je inhibitor exprese PR-B. Počátek porodu, ať už termínového či předčasného, je spojen s významně vyšší expresí genů pro PR-A proti expresi genů pro PR-B, což ve výsledku vede k zástavě působení progesteronu (Pieber et al., 2001, Haluska et al., 2002). Faktory zodpovědné za rozdílnou expresi PR-A a PR-B nejsou dosud zcela zřejmé, ale mohou to být prostaglandiny nebo i prozánětlivé cytokiny – především TNF-alfa (Mesiano, 2004, Madsen et al., 2004). Výše uvedená diferencovaná exprese PR v počátku porodu přitom neprobíhá jen v myometriu, ale je popisována i v děložním hrdle a v plodových obalech (Stjernholm-Vladic et al., 2004, Oh et al., 2005). Dalším možným mechanismem, který se podílí na ovlivnění klidového děložního napětí, je „protizánětlivé“ působení progesteronu. Progesteron je účinným inhibitorem klíčových prozánětlivých cytokinů, působících na materno-fetálním rozhraní, především interleukinu-1 beta a interleukinu-8. Dále jsou k dispozici důkazy o inhibici syntézy prostaglandinů (Shields, et al., 2005). Podobně je prokázáno („in vitro“ i „in vivo“) , že progesteron inhibuje expresi MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Tento chemokin je ve zvýšených koncentracích nalézán v séru matky během termínového i předčasného porodu. Je zodpovědný za influx monocytů do myometria. Monocyty se dále diferencují ve tkáňové makrofágy , tyto posléze produkují další cytokiny, matrixmetalloproteinázy a prostaglandiny ,což přispívá k udržení zánětlivého stavu (Shynlova et al., 2007) .

5.2.2. Remodelace děložního hrdla

Děložní hrdlo (cervix) představuje relativně pevnou bariéru, která působí jako mechanická i funkční protiváha děložního těla po celou dobu těhotenství , a to i přes narůstající nitroděložní tlak, jehož hodnoty stoupají přímo úměrně délce těhotenství. Z histologického pohledu obsahuje děložní hrdlo proti myometriu podstatně menší množství myofibril a naopak, je v něm zastoupeno více kolagenních vláken i mezibuněčné hmoty. V průběhu fyziologického těhotenství

dochází v děložním hrdle k přirozeným a pozvolným změnám – zrání neboli remodelaci . Tyto pochody zahrnují změny kvalitativní i kvantitativní, především zkracování, dilataci a měknutí . Remodelace děložního hrdla probíhá stejným mechanismem u fyziologického průběhu těhotenství i předčasného porodu, liší se však způsobem aktivace i rychlostí změn (Holt et al., 2011). Přesný aktivační signál remodelace hrdla u fyziologického těhotenství není znám. Za patologických podmínek v průběhu těhotenství, nejčastěji při infekci v porodních cestách, uvedené procesy nastupují časněji (v různých fázích těhotenství) a probíhají i rychleji. V takovém případě jsou nazývány inkompetencí děložního hrdla. (viz kapitola 5.4.7) Molekulární a buněčný základ remodelace hrdla spočívá v průběhu těhotenství v regulaci složení mezibuněčné hmoty - extracelulární matrix. Zrací pochody děložního hrdla jsou charakterizovány snížením koncentrací kolagenu a rozptýlením kolagenních fibril. Druhé jmenované bývá přisuzováno zvyšování produkce glykosaminoglykanů fibroblasty, zejména decorinu a hyaluronové kyselině. Glykosaminoglykany podporují v děložním hrdle navýšení obsahu vody. Dalším mechanismem, který se podílí na remodelaci děložního hrdla, jsou změny permeability cervikálního epitelu (Timmons et al., 2007) . Podrobnosti však nejsou známy. Především dilatace hrdla představuje zánětlivý fenomén, tento proces je i za fyziologických podmínek spojen s přílivem makrofágů a neutrofilů, které zahajují degradaci extracelulární matrix. Za patologických podmínek, především infekci, dochází k akceleraci uvedeného procesu (Liggins et al., 1981, Hassan et al., 2006). Chemokiny, jako jsou např. interleukin – 8 a S100A9, přitahují různé typy buněk, které se účastní zánětlivého procesu, tyto postupně uvolňují různé prozánětlivé cytokiny, jako jsou např. TNF-alfa a interleukin-1beta. Uvedené cytokiny dále stimulují syntézu prostaglandinů, které samy o sobě podporují zrací pochody v děložním hrdle (Roth et al., 2003) . TNF-alfa i interleukin-1beta mohou dále aktivovat signální dráhu důležitého regulátoru transkripce - nukleárního faktoru kappa B (NF- kB) . NF- kB může blokovat aktivity zprostředkované progesteronovým receptorem. Vzájemné interakce mezi NF- kB a progesteronovým receptorem tak představují funkční bázi „protizánětlivého“ působení progesteronu v reprodukčních orgánech (Van der Burg , 1996) .

5.2.3. Aktivace deciduy a plodových obalů

Pojem aktivace plodových obalů zahrnuje soubor biochemických a anatomických pochodů, které vedou k oddělení dolního pólu vaku blan od deciduy, event.k spontánnímu puknutí vaku blan. V průběhu těhotenství splývá amniochoriální membrána s deciduou. V rámci přípravy k porodu probíhají v oblasti deciduy a plodových obalů biochemické procesy, jejichž cílem je umožnit oddělení a následně po porodu plodu i vypuzení plodových obalů. Děje se tak především degradací mezibuněčné hmoty v oblasti deciduy a plodových obalů. Fibronektiny patří mezi adhezivní

proteiny, jsou zodpovědné za kompaktnost extracelulární matrix. Fetální fibronektin patří mezi zástupce této skupiny extracelulárních proteinů. Degradaci fetálního fibronektinu různými proteolytickými enzymy v choriodeciduálnímu prostoru - v souvislosti s přípravou k porodu - následuje jeho uvolňování do cervikovaginálního sekretu. Zde je pak prokazován bezprostředně před termínovým i předčasným porodem (Lockwood et al., 1991, Iams et al., 1995, Oshiro et al., 1996). Nejvýznamnější skupinu proteolytických enzymů, které se podílejí na degradaci kolagenu, elastinu, fibronektinu a další mezibuněčné hmoty, představují matrixmetalloproteinázy – MMP. (viz kapitola 5.3.3) Tvorbu MMP stimulují během předčasného i termínového porodu především prozánětlivé cytokiny a prostaglandiny, ale přesný regulační mechanismus aktivace deciduy a plodových obalů není stále objasněn. Určitým vodítkem k dalšímu výzkumu byla studie Lockwooda, který již v 90. letech minulého století dokázal, že progesteron inhibuje expresi některých MMP (MMP-1) v decidue. Jeho další, recentní, práce na tkáňových kulturách dále prokazuje, že během porodu dochází ke snížení působení progesteronu v decidue. Uvedené je nejen v kontextu s dosud známými poznatky (viz kapitola 5.2.1.2), ale zároveň naznačuje, že snížené působení progesteronu může být zodpovědné za upregulaci některých MMP v decidue (Lockwood et al., 1998, Lockwood et al., 2010). Kromě proteolytické degradace deciduální a amniochoriální extracelulární matrix existují důkazy o tom, že zejména předčasný odtok plodové vody – PPRM - je též spojen a apoptózou buněk amnia a také lokální zánětlivou reakcí (Bell et al., 2004).

5.2.4. Úloha prostaglandinů

Samostatnou roli hrají během porodu prostaglandiny. Je prokázáno, že právě tyto látky fungují jako klíčové mediátory společné dráhy předčasného i termínového porodu. Prostaglandiny mohou měnit kontraktilitu myometria, remodelovat děložní hrdlo a podílet se i na aktivaci deciduy a plodových obalů (Ritchie et al., 1984, Rajabi et al., 1991, Romero et al., 1994). Regulace syntézy prostaglandinů probíhá na různých úrovních. Syntéza prostaglandinů je zahájena uvolněním kyseliny arachidonové z fosfolipidové části buněčné membrány fosfolipázou A2 (PLA2). Tvorba této kyseliny stoupá přímo úměrně délce těhotenství, ale její hladiny se dále nezvyšují v době porodu. Dalším krokem je tvorba meziprojektu - PGH₂ pomocí enzymu prostaglandinsyntházy (PGHS) PGHS existuje ve dvou isoformách – PGHS – 1 a – 2. PGHS – 1 je exprimována konstitutivně, zatímco exprese PGHS – 2 (nazývaná také jako cyklooxygenáza – 2 – COX - 2) je regulována různými prozánětlivými cytokiny a dalšími faktory. Prozánětlivé cytokiny se tedy tímto způsobem podílejí na zvýšení syntézy prostaglandinů. Některé studie ukazují, že je exprese genu pro PGHS – 2 je regulována transkripčním faktorem – nukleárním faktorem kappa B (NF-kB)

(Challis et al., 2000). PGH2 je dále rychle konvertován různými enzymy na biologicky aktivní prostaglandiny. Plodové obaly (amnion a chorion) produkují především prostaglandin E2 (PGE2), decidua syntetizuje výhradně prostaglandin F2alfa (PGF2alfa), v myometriu produkuje především prostacyclin - PGI2 (Romero et al., 1996). Množství a produkce prostaglandinů – poměr aktivně působících látek a jejich metabolitů - je v plodových obalech a placentě řízeno pomocí enzymu prostaglandindehydrogenázy (PGDH). Expresi genu pro PGDH je, podobně jako PGHS, regulována různými cytokiny a steroidními hormony . Například progesteron expresi genu pro PGDH stimuluje (Patel et al., 1999) . Na druhou stranu, kortisol zvyšuje expresi genu pro PGHS – 2 v placentě a plodových obalech a naopak snižuje expresi genu pro PGHD, tímto způsobem podporuje udržení hladiny prostaglandinů v uvedených tkáních (McKeown et al., 2003) . Způsobů, jakými prostaglandiny působí v cílovém orgánu – děloze , je několik. Přímě ovlivňují kontraktilitu myometria tím, že facilitují tok vápenatých iontů do sarkoplasmy , jak influxem buněčnou membránou, tak jejich uvolňováním ze zásobních míst v sarkoplazmatickém retikulu. Dále zvyšují expresi genů pro oxytocinové receptory a CAP, především connexin-43 (viz kapitola 5.2.1.1) (Olson, 2003) . Prostaglandiny také indukují syntézu některých MMP buňkami plodových obalů a děložního hrdla. Tímto způsobem se nepřímě podílejí jak na aktivaci deciduy a plodových obalů, tak remodelaci děložního hrdla degradací kolagenu (Yoshida et al., 2002) . Jsou k dispozici důkazy tom, že prostaglandiny E2 i F2alfa zvyšují poměr exprese genu pro PR-A proti PR-B a ovlivňují tak „zástavu“ působení progesteronu (Madsen et al., 2004) . (viz kapitola 5.2.1.2)

5.2.5. Úloha oxytocinu

Mateřský oxytocin je hormon, který je produkován hypotalamem a uvolňován portálním systémem do zadního laloku hypofýzy. Z těchto míst je pulsatilně secernován do systémového oběhu matky. V něm setrvává poměrně krátce, jeho biologický poločas je zhruba 3-4 minuty. Je odbouráván játry a ledvinami, v těhotenství je navíc degradován placentární oxytocinásou. Koncentrace oxytocinu produkovaného hypotalamem matky se v systémové cirkulaci příliš nemění, stoupají významně až během druhé doby porodní (Zeeman et al., 1997) . Studie hodnotící rozdíl arteriovenózních koncentrací oxytocinu v pupečníku a jeho hladiny v plodové vodě a fetální moči zjistila, že plod produkuje oxytocin společně s matkou a podílí se tak zřejmě na ovlivnění porodu (Dawood et al., 1978) . Zatímco koncentrace oxytocinu v mateřském oběhu zůstávají po celou dobu těhotenství stacionární a vrcholí až s koncem porodu, zvyšuje se v myometriu během porodu počet oxytocinových receptorů. Ve srovnání s obdobím před těhotenstvím je počet

oxytocinových receptorů v prvním trimestru přibližně 50-100x vyšší, během porodu pak až více jak 200-300-násobný (Fuchs et al., 1981 , Fuchs et al., 1982) . Exprese oxytocinových receptorů je podporována estrogeny a inhibována progesteronem (Van Meir et al., 1997) . Interakce oxytocinových receptorů s ligandem ústí v interakci s G-proteiny, což vede ke stimulaci fosfolipázy C a dále pak k produkci inositoltrifosfátu (ITP) a influxu kalcia do buněk. (viz kapitola 5.2.1.1) Počátek porodu tedy není spojen s vzestupem koncentrací oxytocinu v mateřské krvi (s výjimkou druhé doby porodní) , ale se zvýšením počtu jeho receptorů. Oxytocin během porodu však nepůsobí jen přímo na své receptory, ale stimuluje i syntézu prostaglandinů deciduou (Fuchs et al., 1981) .

5.2.6. Fetální osa hypotalamus – hypofýza – nadledviny

Práce, které studovaly hormonální pozadí porodu, zjistily, že v pozdní fázi těhotenství dochází ve fetální cirkulaci k vzestupu hladiny nadledvinových steroidů, především kortizolu (Lockwood et al., 1996) . Maturace fetální osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny je v současnosti považována za důležitou součást společné dráhy termínového a předčasného porodu . Primární impuls k zahájení maturace není znám, zatím se předpokládá, že na jejím počátku stojí produkce kortikotropin-releasing hormonu (CRH) fetálním hypotalamem a/nebo placentou (viz níže „placentární hodiny“) (Liggins et al., 1994) . Důsledkem dozrání uvedené osy je především dramatický vzestup syntézy dehydroepiandrosteron sulfátu (DHEAS) ve fetálních nadledvinách. V placentě je z DHEAS aromatizací vytvářen estron, tento je fetálními játry dále hydroxylován a v následně je - opět v placentě - z vytvořeného 16-hydroxy-17 beta estradiolu syntetizován estriol (Madden et al., 1978) . Především estriol, jako klíčový finální produkt , je zodpovědný za hlavní funkci estrogenů v těhotenství – upregulaci CAP genů. Expresí těchto genů se vytváří důležité proteiny, které tvoří základ mezibuněčných spojení a prostaglandinových a oxytocinových receptorů (Challis et al., 1996) . (viz kapitola 5.2.1.1) . Estrogeny dále zvyšují expresi oxytocinových a prostaglandinových receptorů. Buněčné a molekulární mechanismy , které jsou podkladem maturace fetální osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny, nejsou zcela kompletně prozkoumány, nicméně lze předpokládat upregulaci četných genů na kterékoliv úrovni osy. Také placenta vytváří velké množství CRH – je hlavním zdrojem jeho koncentrací v mateřském séru. Placentární CRH je uvolňován jak do oběhu plodu, tak i matky. Koncentrace CRH v mateřské cirkulaci tedy zahrnují mateřskou i placentární produkci tohoto hormonu, kolísají od 500 do 3000 pg/mL v třetím trimestru a vrcholí těsně před porodem. . Po porodu se hladiny CRH velmi rychle vracejí k nízkým hodnotám, u netěhotných se pohybují mezi 10 až 100 pg/mL (Golland et al.,

1986). Na rozdíl od klasické zpětné vazby, kdy kortikoidy tlumí produkci CRH , je jsou geny pro placentární CRH upregulovány kortikoidy produkovanými fetálními nadledvinami . A naopak, placentární CRH u plodu stimuluje hypofýzu a tím následně tvorbu fetálních nadledvinových steroidů . Tyto poznatky jsou velmi důležité ve vztahu k pochopení předčasného spuštění fetální osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny (King et al., 2001) . V r. 1995 byla navržena koncepce tzv. „placentárních hodin“. Tento termín navrhl na základě své práce McLean. Prospektivně hodnotil soubor 465 těhotných , kdy byla hladina CRH opakovaně hodnocena počínaje 16.-20.týdnem těhotenstvím. Rychlý vzestup hladin tohoto hormonu ve studii korespondoval s následným porodem, ať už proběhl předčasně nebo v termínu. Pod pojmem „placentární hodiny“ si představuje hypotetický „časovač“ délky těhotenství, který je nastaven již v době početí. Předložil teorii, kdy CRH (pravděpodobně placentárního původu) působí jako „startér“ uvedeného „časovače“ (McLean et al., 1995) . Nicméně žádná z prací dosud nepotvrdila klinickou využitelnost měření hladin CRH v predikci předčasného porodu, pravděpodobně díky velkému kolísání hladin CRH intra- i interindividuálně (placentární i mateřský původ CRH v mateřské cirkulaci) (Coleman et al., 2000) . Jedna studie na zvířatech ukázala pozoruhodný závěr. Podvýživa matky v době početí může vést k předčasné aktivaci fetální osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny a tedy předčasnému porodu. Není však známo, jaký mechanismus je za uvedenou předčasnou aktivaci zodpovědný, zvažováno je zrychlení „placentárních hodin“ (Bloomfield et al., 2004) . Podobně byla zaznamenána předčasná aktivace fetální osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny i při stresové situaci na straně plodu (např. při experimentální hypoxémii u plodů ovcí) (Challis , 1996) . Mateřský a fetální stres provázený vtestupem hladin CRH může tedy spojen s předčasným porodem, bude dále uvedeno v kapitole 5.4.8. Kromě DHEAS, který je důležitým prekursorem syntézy estrogenů, se plod a placenta vzájemně podílí na tvorbě dalších kortikoidů. Kortizol reguluje syntézu prostaglandinů. (viz kapitola 5.2.4.)

5.3. Zánět jako hlavní mechanismus předčasného porodu

5.3.1. Role zánětu v patogenezi předčasného porodu

Zánět je definován jak odpověď vaskularizovaných orgánů na zevní podnět. První ucelený popis zánětu je připisován Celsovi , který uvedl čtyři z pěti klasických příznaků – calor, dolor, rubor a tumor (v překladu zvýšená teplota, bolest, zarudnutí a otok) . Galén přidal pátý příznak – functio laesa (v překladu narušení funkce) . Od jejich dob je zánět klasicky definován přítomností uvedených pěti příznaků. S vývojem medicíny přibyl poznatek, že jsou všechny změny důsledkem působení cytokinů, chemokinů a ostatních prozánětlivých látek lokálně ovlivňujících cévy a tkáň.

Vazodilataci a zvýšené cévní permeabilitě jsou připisovány zvýšení teploty, zarudnutí a otok tkání, zatímco migrace zánětlivých buněk a působení jejich mediátorů v místě zánětu jsou zodpovědné za vznik bolesti a otoku. Dalším aspektem hodnocení zánětu je jeho histologické vyjádření. Histologický zánět je definován infiltrací tkáně neutrofily, makrofágy a lymfocyty (Ley, 2001).

Uvedená definice může mít poněkud limitované využití v reprodukčních orgánech. Například, pokud histopatolog hodnotí akutní zánět sliznice děložní – endometritis, musí vzít v potaz, v jaké fázi menstruačního cyklu se pacientka nachází. Od perimenstruačního endometria se totiž endometritis histologicky liší jen mírně – rozsahem infiltrace neutrofily (Kiviat, 1990). V předcházejících kapitolách je předestřeno zapojení systémů realizující zánětovou odpověď organismu na jednotlivých úrovních společné dráhy předčasného a termínového porodu. Obecně platí, že zlatým standardem hodnocení přítomnosti zánětu je jeho patologicko-anatomický průkaz z biopsie. Nicméně nežli dojde k jeho histologickému vyjádření, je zde určité časové „okno“, ve kterém může zánět probíhat subklinicky, jen na molekulární úrovni a ve výsledku nemusí být zánětlivý proces histologicky prokázán. Tento příklad je typický pro předčasný porod. Zdaleka ne u všech předčasných porodů je prokazován zánět na úrovni plodových obalů či pupečníku a jen u naprosté menšiny případů jsou přítomné systémové projevy, typické pro plný rozvoj zánětu (horečka apod.) (Yoon et al., 2001 , Haddad et al., 2004) . Zánět lze rozdělit jednak na lokální (ohraničeně v určité části těla) a systémový (zánětová odpověď probíhá celotělově, neohraničeně). Dále je z jiného pohledu dělen na obranný a autoagresivní, podle toho, jaký je výsledný efekt na cílové tkáně, případně celý organismus. Mezi systémy, které mají klíčovou úlohu v zánětovém procesu, patří endotel, krevní destičky, leukocyty, plazmatický koagulační systém a komplement. Řada mediátorů produkovaných těmito systémy má schopnost poškozovat i vlastní tkáně , proto je základní podmínkou zánětu jako obranného fenoménu lokalizace a regulace zánětových procesů. Dysregulace a delokalizace je typická pro autoagresivní zánět (Šimák, 2000) . Podle dostupných dat lze soudit, že patogenetickým podkladem předčasného porodu je dysregulovaný zánět. Na příkladu infekce (jako nejčastější příčiny předčasného porodu) lze nastínit obecné patogenetické procesy, které probíhají jako reakce organismu na kontakt s ní :

1. migrace buněk a tvorba mediátorů, které mají potlačit infekci
2. vytvoření bariéry proti šíření infekce
3. podpora reparace tkání.

Při infekci vstupují do tkání makrofágy, neutrofily a lymfocyty. Molekuly, uvolňované v reakci na přítomnost mikrobů, mohou dále stimulovat neutrofily/makrofágy k tvorbě reaktivních forem kyslíku (hydroxylový radikál OH , superoxidový aniontový radikál O₂⁻). Reaktivní formy kyslíku

produkované takto v obrovském množství mají nejen cytotoxický potenciál proti bakteriálním buňkám, ale mohou působit i autoagresivně. Způsobují peroxidaci membránových fosfolipidů, poškozují membránové i řadu plazmatických proteinů, i nukleové kyseliny. Produkty poškozených tkání patří mezi skupinu látek nazývaných jako DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern molecules). DAMPs však nevznikají jen v důsledku působení mikroorganismů a naopak, bakterie mohou aktivovat zánětlivý proces přímo , jak je uvedeno v následující kapitole . Dalším úkolem systémů realizujícím zánětovou odpověď je omezit šíření mikroorganismů, což je mj. úkol pro plazmatický koagulační systém. Za fyziologických podmínek je v tomto směru jeho hlavním cílem lokalizace zánětlivé odpovědi. Ve specifických podmínkách, jaké s sebou nese uteroplacentární mikrocirkulace, zde však může nadměrná generace trombinu dále podpořit proces vedoucí k předčasnému porodu. (viz kapitola 5.4.2) Nejčastější a nejpravděpodobnější vstupní branou infekce je děložní hrdlo , odtud dále choriodeciduální prostor. Předpokládáme-li vstupní bránu na této úrovni, pak je zánětlivá reakce - provázená aktivací plazmatického koagulačního systému - ohraničena především na uteroplacentární mikrocirkulaci (Chaiworapongsa et al., 2002) . Kdybychom tedy měli na příkladu infekce vyhodnotit typ, rozsah a lokalizaci zánětlivé odpovědi u předčasného porodu, jedná se o autoagresivní proces . Z časového pohledu probíhá převážně chronicky . Rozsahem je prakticky vždy ohraničený , ale protože se týká dělohy a někdy i plodu (viz dále riziko fetální zánětlivé odpovědi) , je výsledkem kaskády zánětlivých pochodů vypuzení plodu (Romero et al., 2007) . V předchozím textu je opakovaně uvedeno , že je zánět zapojen do předčasného i termínového porodu. Oba porody se mezi sebou liší nejen způsobem a časováním aktivace, ale také „robustností“ a lokalizací zánětlivého pochodu. Aktivace termínového porodu není přesně známa, u spontánního předčasného porodu předpokládáme různé spouštěcí mechanismy, uvedené v kapitole o patofyziologii předčasného porodu. S tím souvisí i časování aktivace, předčasný porod je spojen s abnormálním spuštěním procesu. V neposlední řadě platí, že zatímco fyziologický termínový porod s sebou nese jen zapojení jednotlivých výše uvedených komponent společné dráhy , předčasný porod může být spojen i s fetální zánětlivou odpovědí, která výrazně komplikuje poporodní prognózu dětí. Bezpochyby lze očekávat u předčasného porodu i větší intenzitu zánětlivé odpovědi, která souvisí s možnou vyvolávající příčinou, nejčastěji infekcí. (viz kapitola 5.4.1) Zatímco u termínového porodu dochází jen k lehkým odchylkám o normálních hodnot běžně využívaných zánětlivých parametrů, u předčasného porodu (zejména, je-li přítomna současně probíhající infekce) , mohou být hodnoty zvýšeny více. Zánět je nadřazený pojmu „infekce“, neboli infekce představuje jen jednu z možných vyvolávajících příčin zánětlivého procesu obecně. Pro praxi to s sebou tedy nese důležitý poznatek, ne vždy je elevace zánětlivých markerů způsobena infekcí. Jen z hodnot zánětlivých markerů ze séra matky nelze spolehlivě

rozpoznat, zda je jejich vzestup spojen se současně probíhající infekcí nebo zdali se jedná jen o obraz zánětové aktivity, provázející spontánní předčasný porod. Navíc, vzestup standardně využívaných zánětlivých markerů (počet leukocytů v krevním obrazu, CRP) může provázet již nevratně probíhající předčasný porod - je laboratorním obrazem vyvrcholení dosud skrytého zánětového procesu. Na druhou stranu, ani negativní hodnoty zánětlivých parametrů nevylučují bezprostřední riziko předčasného porodu. Z toho důvodu nelze využít standardní zánětlivé markery využít k predikci předčasného porodu. Uvedené informace komplikují nejen stanovení rizika předčasného porodu (a případnou účast infekce) pomocí dosud známých zánětlivých markerů, ale i predikci případné fetální zánětlivé odpovědi plodu (Wei, 2010) . Proto probíhá řada výzkumných projektů, jejichž náplní je hledání nových biochemických parametrů . První skupina výzkumných prací je zaměřena na predikci předčasného porodu v běžné klinické praxi u žen, kterým hrozí bezprostřední riziko předčasného porodu. Druhou skupinu představuje hledání nových metod, které mají za cíl odhalit intraamniální zánět/infekci – především fetální zánětlivou odpověď - FIRS - u hrozícího nebo již probíhajícího předčasného porodu. Právě fetální zánětlivá odpověď zvyšuje riziko dlouhodobého handicapu dětí a ztěžuje jejich začlenění do společnosti. V kapitole 7 jsou uvedené současné možnosti predikce předčasného porodu a fetální zánětlivé odpovědi.

5.3.2. Molekulární mechanismus aktivace zánětového procesu u předčasného porodu

V této části práce uvedu , jaký je předpokládaný molekulární mechanismus aktivace zánětlivého procesu u předčasného porodu. V patogenezi předčasného porodu se uplatňují především cytokiny, matrixmetalloproteinázy a prostaglandiny. První studie, které odhalily jejich účast v procesu předčasného porodu, byly publikovány až na konci 80.let minulého století (Gomez et al., 1997 , Romero, Mazor, 1988). Od té doby došlo k obrovskému pokroku v chápání problematiky patofyziologie předčasného porodu, výzkum se posunul na molekulární a genetickou úroveň. V současnosti je známo, že spouštěcí roli mají především pattern recognition receptors – PRR (není přesný český ekvivalent) (Patni et al., 2007) . PRR představují proteiny, které jsou exprimovány různými imunokompetentními buňkami. Tyto receptory patří mezi důležité „vstupní brány“ vrozené imunity a jsou dále klasifikovány dle své funkce a buněčné lokalizace na :

1. solubilní PRR, mezi patří především proteiny akutní fáze, např. C-reaktivní protein, fungují jako opsoniny a pomáhají odstraňovat patogeny ve spolupráci s komplementem a fagocyty
2. transmembránové buněčné receptory, mezi něž patří především Toll-like receptory (TLR – viz níže)

3. intracelulárně uložené receptory typu např. Nod1, Nod2, které zprostředkovávají rozpoznávání intracelulárně uložených patogenů, např. virů

(Janeway et al., 2005) . PRR umí identifikovat určité molekulární struktury společné většině mikroorganismů. V odborné literatuře se shrnují pod zkratkou MAMPs (microbe-associated molecular pattern) Stejně tak ale PRR váží i „nebezpečné signály“ z poškozených tkání – tzv. DAMPs (damage associated molecular pattern molecules). Poškození může být přitom různého původu , tj. působením zevních faktorů fyzikální povahy, cizorodých i tělu vlastních chemických látek a toxinů (zejména bakteriálních) , nadměrné nebo nedostatečné stimulační přírodními podněty, nedostatkem energie (nejčastěji hypoxie), působením komplementu, hromaděním metabolitů a působením kyslíkových (oxidativní stres) či jiných radikálů. DAMPs zahrnují různé cytosolové a jaderné proteiny, ale i další molekuly. Mezi dosud známé DAMPs patří především heat-shock protein, high mobility group box – 1 protein (HMGB-1), S100 proteiny a dále proteiny, uvolňované z extracelulární matrix jako důsledek jejího poškození, např. fragmenty kyseliny hyaluronové. Mezi neproteinové DAMPs patří např. adenosintrifosfát (ATP), kyselina močová, heparinsulfát a DNA (Miller et al., 2011) . Na rozdíl od MAMPs patří tyto molekuly mezi hlavní iniciátory „neinfekční“ zánětlivé odpovědi a představují tak možný způsob aseptické aktivace předčasněho porodu . Nejvýznamnější a nejlépe prostudovanou podskupinu PRR představují Toll-like receptory - TLR. Navázáním ligandu na PRR/TLR receptory dochází k aktivaci nukleárního faktoru kappa B , jeho stimulaci provází stimulace transkripce genů pro cytokiny , matrixmetalloproteinázy a růstové faktory. TLR jsou exprimovány nejen imunokompetentními buňkami, ale i deciduou a amniocyty. Právě choriodeciduální prostor, vymezený na jedné straně děložní sliznicí a na druhé straně strukturami odvozenými do trofoblastu (amnion, chorion), představuje pravděpodobně nejvýznamnější „spouštěcí zónu“ předčasněho porodu. Typickým příkladem je např. průnik mikroorganismů do této oblasti (Krikun et al., 2007) . Právě výše uvedená kaskáda, tj. navázání DAMPs/MAMPs na PRR představuje, podle dosavadních znalostí, molekulární podklad etiopatogeneze předčasněho porodu (Romero , Espinoza et al., 2007) . U části etiopatogenetických spouštěcích mechanismů je vztah k aktivaci PRR prokázán (zejména infekce, uteroplacentární ischemie), u některých dalších zatím informace chybí, přestože v obou případech následuje proces vedoucí k předčasnému porodu, ve kterém je účast zánětu nepochybná (Thaxton et al., 2010) . Nejnovější práce ukazují, že jsou TLR zapojeny nejen do předčasněho, ale i do termínového porodu (Kim et al., 2004, Youssef et al., 2009) . Některé z cytokinů mají prozánětlivé účinky, např. interleukin – 1beta, 6, 8, TNF – alfa , některé protizánětlivé, např. interleukin – 10, u některých se jejich úloha mění dynamicky v průběhu zánětu, např. TGF – transforming growth factor. Prozánětlivé cytokiny (především interleukin -1beta, interleukin-6 a - 8

a a TNF- alfa) mají zásadní význam v etiopatogenezi předčasného porodu, bez ohledu na přítomnost infekce (Romero et al., 1998). Stimulují syntézu matrixmetalloproteináz (MMP) ve sliznici děložní a v plodových obalech. Prozánětlivé cytokiny se také podílejí na stimulaci syntézy prostaglandinů (Christiaens et al., 2008). Prostaglandiny mají během porodu klíčovou úlohu. (viz kapitola 5.2.4) TGF – beta1 představuje jeden z cytokinů startovací fáze zánětu, zároveň je studován v souvislosti s tolerancí plodu matkou (Schumacher et al., 2007). O interleukinu – 10 je pojednáno v kapitole 5.4.1.2

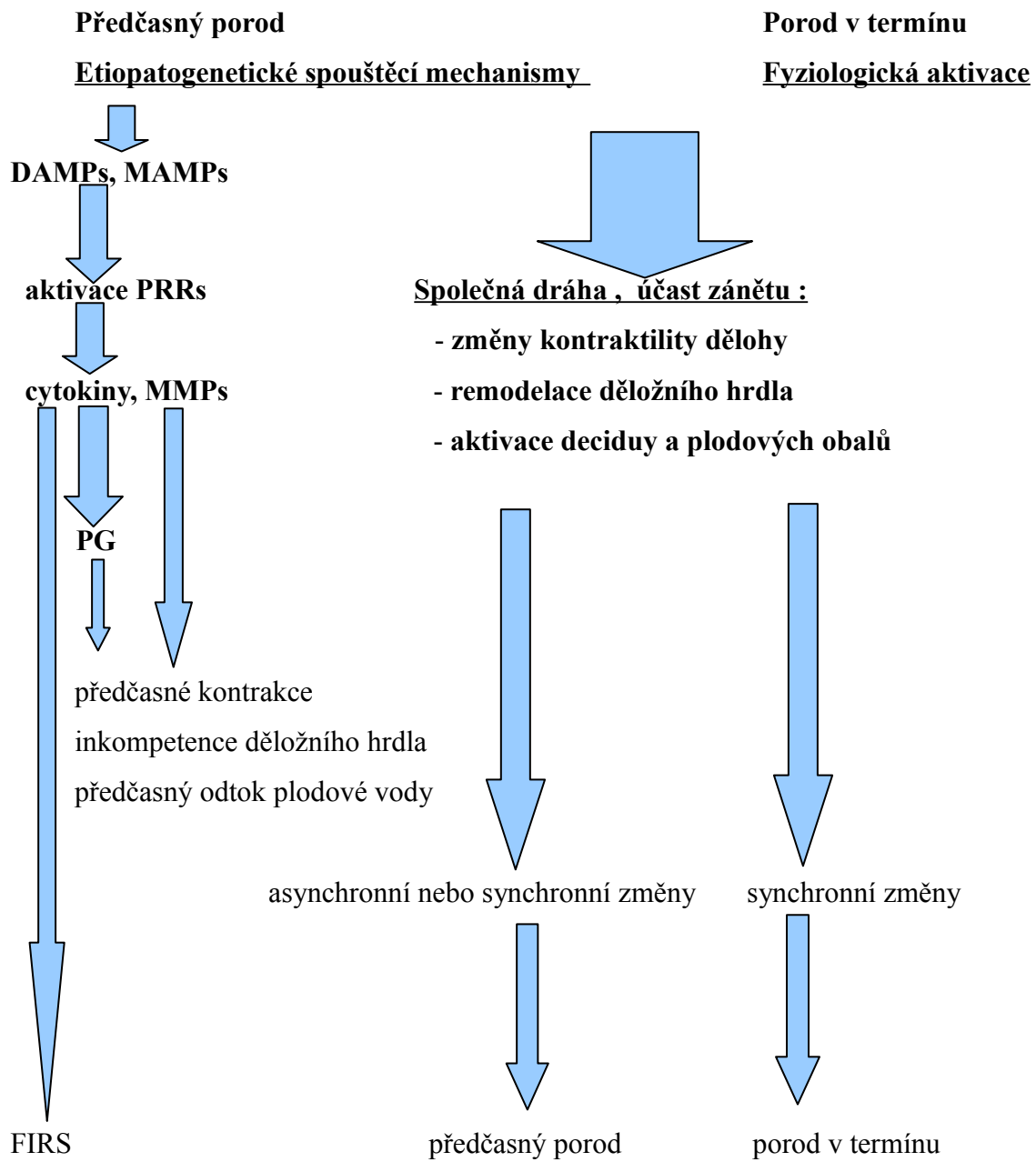
5.3.3. Role matrixmetalloproteináz v patogenezi předčasného porodu

Úloze MMP v decidue, plodových obalech a plodové vodě se dostává ve výzkumu předčasného porodu stále více pozornosti. MMP nejsou jen důležitým zprostředkovatelem patologického procesu vedoucímu k předčasnému porodu, ale hrají jednu z klíčových rolí i během porodu v termínu, především v procesu remodelace děložního hrdla a aktivace deciduy a plodových obalů (Weiss et al., 2007). (viz kapitola 5.2.3) Stejně tak se MMP podílejí na řadě fyziologických procesů. Degradace pojivové tkáně za intenzivní účasti MMP je děj, který probíhá při ontogenetických změnách v organismu, jako je například růst, morfogeneze, ale také hojení ran a poškození tkání. S tím také souvisí aktivita MMP při onemocněních a patologických procesech týkajících se pojivové tkáně, jako jsou záněty, kožní či nádorová onemocnění. V organismu se vyskytují ve více formách a modifikacích, které se liší jednak umístěním a jednak specifitou k určitému substrátu. Matrixmetalloproteinázy představují zajímavou skupinu zinek-dependentních enzymů, patří mezi třídu metalloproteáz (Rawlings et al., 1995). Buněčné zdroje MMP jsou různé, ve zdravé tkáni se na jejich produkci podílejí především endotelie a fibroblasty, v reprodukčním systému jsou jejich bohatým zdrojem v průběhu těhotenství decidua a plodové obaly. Dalším významným zdrojem jsou pak neutrofilní granulocyty a makrofágy. Nejčastěji je skupina MMP dále dělena dle substrátové specifity a částečně dle buněčné lokalizace. Mezi čtyři základní podskupiny patří kolagenázy, gelatinázy, stromelysiny a membránové MMP (membrane type MMP – MT-MMP). Kolagenázy štěpí molekulu kolagenu, gelatinázy štěpí především kolagen, jsou však schopné štěpit i fibronektin, agrekan a elastin. Stromelysiny mají relativně širokou substrátovou specifitu, štěpí především nekolagenní proteiny extracelulární matrix, jako jsou proteoglykany, glykoproteiny, fibronektin a laminin. MT-MMP vykazují podobnou substrátovou specifitu jako analogické volné MMP. Většina těchto enzymů (kromě membránových MMP) je z buňky secernována ve formě proenzymu, který je podle potřeby pro samotné štěpení aktivován ionty zinku. Mimo jiné se v molekule MMP vyskytují ještě ionty vápníku, které mají strukturální funkci. MMP mohou být regulovány na mnoha úrovních. Od inhibice a aktivace samotných latentních

MMP, přes regulaci sekrece molekuly enzymu, až po regulaci transkripce genu či inhibice aktivity MMP pomocí tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP). Geny pro tvorbu tkáňově specifických MMP jsou ovlivňovány pomocí biologicky aktivních molekul, jako jsou růstové faktory, cytokiny, onkogeny a tumorové promotory (Bode, 2003). Různé linie výzkumu prokázaly, že jsou MMP zapojeny v rámci aktivace deciduy a plodových obalů jak do termínového, tak především předčasného porodu. V souvislosti s předčasným porodem byly dosud studovány především gelatinázy (především MMP-2 a -9) a kolagenáza MMP-8. Z dosud dostupných údajů vyplývá, že gelatináza MMP-9 hraje zřejmě důležitou úlohu u předčasného a termínového porodu, v rámci patologie pak elevace kolagenázy MMP-8 v plodové vodě provází intraamniální zánět (Romero et al., 2007). (viz kapitola 6.2) O MMP-2 bylo dosud publikováno poměrně málo údajů. Závěrem většiny prací (hodnotících hladiny MMP-2 v plodové vodě či aktivitu enzymu v plodových obalech a placentě) bylo, že jsou hladiny MMP-2 během předčasného porodu neměnné či zvýšené (Maymon et al., 2001, Ping et al., 2002). Nicméně jedna z prací prokázala naopak snížení hladin MMP-2 v plodové vodě u předčasného porodu (Maymon et al., 2000). Naopak, dvě publikované práce prokázaly elevaci hodnot MMP-9 v plodové vodě i mateřském séru u probíhajícího předčasného porodu (Maymon et al., 2000, Makrakis et al., 2003, Kramer et al., 2009).

Obrázek 1

Schéma (pato)fyzologie předčasného a termínového porodu



5.4. Syndrom předčasného porodu

V přechodném textu je uvedeno, že se v etiopatogenezi předčasného porodu uplatňuje více příčin. Povaha spontánního předčasného porodu tedy naplňuje definici syndromu (Romero et al., 2004). Pojem „syndrom“ je v literatuře většinou definován jako soubor příznaků, který formuje určitý klinický obraz nebo nemoc, ale může být způsoben více příčinami.

5.4.1. Infekce a předčasný porod

5.4.1.1. Role infekce v patogenezi zánětlivého procesu předčasného porodu

Za nejvýznamnější příčinu předčasného porodu považujeme infekci – dostupná data však ukazují, že samotné infekční agens nestačí k spuštění procesu předčasného porodu, musí být navíc přítomna genetická predispozice (interakce genů s prostředím) (Romero, Espinoza, 2004). Působením mikroorganismů se může rozvinout mateřská zánětlivá odpověď – chorionamnionitis (zánět deciduy a současně i plodových obalů) a/nebo fetální zánětlivá odpověď – Fetal Inflammatory Response Syndrome – FIRS (Romero et al., 1998). Mikroorganismy jsou rozpoznány mechanismy vrozené imunity – tj. různými typy TLR/PRR, jak je uvedeno výše. Příčinou této komplexní odpovědi však nemusí být jen infekce, viz výše DAMPs. (kapitola 5.3.2) Fetální i mateřská zánětlivá odpověď se souhrnně nazývá intraamniální infekce/zánět. Tento pojem se v anglosaském písemnictví používá pro takovou (vrcholící) fázi předčasného porodu, která se již může projevit klinicky (viz níže) a kdy lze zánětlivou odpověď objektivně prokázat různými biochemickými vyšetřeními a/nebo histopatologickými nálezy (v druhém případě až „ex post“ po porodu) (Romero et al., 2007). Jak je uvedeno v předcházejícím textu, do předčasného i termínového porodu jsou zapojeny systémy realizující zánětovou odpověď organismu. Odlišit vzájemně zánět od infekce, jako jedné z vyvolávajících příčin, je poměrně obtížné. O infekci hovoříme tehdy, jsou-li prokázány v průběhu předčasného porodu bakterie odběrem plodové vody (zatím pouze v experimentu), naopak absence mikroorganismů a elevace il-6 a MMP-8 v plodové vodě jsou patognomické pro zánět, bez ohledu na typ vyvolávající příčiny. Hodnocení prevalence MIAC (která se dle různých studií pohybuje přibližně mezi 25-40 % všech předčasných porodů) záleží na průkazu mikroorganismů kultivací plodové vody. Nejčastěji nalézánými mikroorganismy v plodové vodě jsou především ureplasmata a mykoplasmata a to i přestože z různých klinických studií je popisována vyšší incidence předčasného porodu i u dalších bakteriálních kmenů. (viz kapitola 3.1.6) Ne všechny mikroorganismy se také daří běžnými mikrobiologickými technikami kultivace prokázat. Spíše naopak, různé zdroje uvádějí, že je možné zachytit jen asi 1% celého

mikrobiální flory dostupnými kultivačními technikami (Relman, 1999). Někteří autoři uvádějí vyšší záchyt MIAC pomocí využití molekulárně biologických technik – PCR průkaz antigenů mikroorganismů. Ukazuje se také , že pacientky s pozitivním PCR průkazem mikrobiálních antigenů a současně negativní kultivací mají stejnou míru zánětlivé odezvy (histologický průkaz zánětu pupečníku, elevace interleukinu – 6 v plodové vodě apod., viz dále v textu níže) jako pacientky s pozitivní kultivací plodové vody (Yoon et al., 2003). Intrauterinní infekce může být také ale přítomna, přestože se její výskyt všemi možnými technikami v plodové vodě neprokáže. Lze předpokládat, že pokud je bakteriální osídlení přítomno v choriodeciduálním prostoru a mikroorganismy nepronikají do plodové vody, nemusí být tyto detekovány odběrem plodové vody. Jsou k dispozici důkazy o tom, že četnost výskytu mikroorganismů v choriodeciduálním prostoru u předčasného porodu je vyšší než ta, která je ve stejné situaci pozorována hodnocením jejich výskytu v plodové vodě. Tento závěr vyplynul z prací, které hodnotily přítomnost infekce v plodových obalech jejich kultivací. Elevace zánětlivých markerů v plodové vodě (interleukinu – 6, MMP – 8) pak dále vypovídá o možné infekci lépe než kultivace plodové vody. Na druhou stranu, zvýšení hladiny těchto parametrů není specifické pro infekci, je obecně patognomické pro zánět. O tom, jestli při vzestupu zánětlivých parametrů v plodové vodě proběhla intrauterinní infekce , je možné se domnívat až „ex post“, pokud je prokázána její přítomnost kultivací plodových obalů po porodu (Andrews et al., 1995) . Ať už je přítomna infekce nebo aseptický zánět, v obou případech je vyšší riziko fetální zánětlivé odpovědi - FIRS. Situaci dále komplikuje fakt, že u určitého procenta spontánních předčasných porodů není objektivně prokázán zánět histologicky, přestože je prokázána elevace markerů zánětu v plodové vodě (interleukinu – 6 a MMP – 8 , viz kapitola 6.2) Pojem FIRS nemá dosud přesný český ekvivalent, nejčastěji jsou používána spojení fetální zánět či fetální zánětlivá odpověď. Analogií je SIRS u dospělých (systémová zánětlivá odpověď – Systematic Inflammatory Response Syndrome). Plody s fetální zánětlivou odpovědí mají vyšší perinatální morbiditu , především intraventrikulární hemorhagii (IVH) těžkého stupně (III. a IV.) , periventrikulární leukomalacii, nekrotizující enterokolitis, bronchopulmonární dysplazii, myokardiální dysfunkci, neonatální sepsi a předčasný porod u nich nastává častěji než u plodů bez zánětlivé odpovědi. U plodů s elevací interleukinu – 6 v pupečnickové krvi je následně post partum významně častěji diagnostikována funisitis (zánět pupečníku), tato je považována za histologický projev FIRS. V současné době se za základní biochemické kritérium FIRS považuje elevace cytokinů (především interleukinu – 6) , zvýšený počet nezralých forem neutrofilních granulocytů a elevace CRP v pupečnickové krvi získané po porodu plodu, histologické (funisitis) a klinické koreláty uvedené výše. Prenatálně (v experimentu) je diagnostickým kritériem elevace interleukinu – 6 z pupečnickové krve získané při kordocentéze (Gomez et al., 1998) .

5.4.1.2. Role cytokinů

Cytokiny hrají v průběhu předčasného porodu velmi důležitou roli. Jsou produkovány v důsledku aktivace PRR receptorů – viz kapitola 5.3.2. Prvním prozánětlivým cytokinem, který byl popsán v souvislosti s předčasným porodem, byl interleukin – 1. Postupně přibývaly zprávy o jeho úloze v průběhu předčasného porodu. Tento cytokin je produkován deciduou a podílí se na stimulaci syntézy prostaglandinů (Romero et al., 1986, Romero, Wu et al., 1989). Podobně existují důkazy o účasti dalšího důležitého prozánětlivého cytokinu – tumor nekrotizujícího faktoru alfa – TNF-alfa. I tento cytokin se podílí na stimulaci syntézy prostaglandinů amniem, deciduou a myometriem (Casey et al., 1989, Romero et al., 1991). Mezi další prozánětlivé cytokiny, jejichž hladiny se zvyšují v průběhu předčasného porodu, jsou především interleukin-6 (elevace jeho hladin v pupečnickové krvi je patognomická pro FIRS – viz výše), interleukin-8, -16, 18, colony-stimulating factor (CSF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage migration inhibitory factor a řada dalších. Prozánětlivé cytokiny se podílejí nejen na spuštění vlastního procesu předčasného porodu, ale se vši pravděpodobností stojí i za negativními dopady FIRS. Existují zjevné důkazy o zapojení cytokinů do patogeneze periventrikulární leukomalacie, která je podkladem dětské mozkové obrny (Kwaja et al., 2008, Leviton, 1995, Yoon et al., 2007). Celá řada dalších prací popisuje vztah fetální zánětlivé odpovědi, charakterizované vzestupem hladin různých cytokinů, k dalším komplikacím, především bronchopulmonální dysplazii – BPD (Speer, 2003, Watterberg et al., 1996, Yoon et al., 2002). Nejvýznamnějším protizánětlivým cytokinem je interleukin – 10. Interleukin – 10 je považován za klíčový v „udržení“ těhotenství (Gotsch, 2008, Trinchieri, 2007). Jeho podání ve zvířecím experimentálním modelu intrauterinní infekce zlepšuje prognózu těhotenství a snižuje pravděpodobnost předčasného porodu (Terrone et al., 2001).

5.4.1.3. Klinický obraz intraamniální infekce/zánětu

Klinicky se intraamniální infekce/záněť většinou projeví až při pokročilém průběhu (horečka matky nad 38 °C, tachykardie matky a/nebo plodu, zvýšený děložní tonus, zapáchající výtok apod.), ve většině případů probíhá spíše subklinicky. Při hrozícím či již probíhajícím předčasném porodu, především při PPROM, musíme vždy vyloučit intraamniální infekci/záněť při přijetí na porodní sál. Senzitivita dosud prováděných vyšetření, tj. stanovení diferenciálního počtu neutrofilních granulocytů a CRP ze séra matky, je poměrně nízká, navíc tato vyšetření vypovídají především o kompartmentu matky, hladiny běžně používaných markerů zánětu nemusí odrážet případnou současnou zánětlivou odpověď plodu. Dle různých studií je zřejmé, že v některých případech vzniká infekce/zánětlivá odpověď plodu (FIRS), i když není přítomna mateřská zánětlivá odpověď např. na mikrobiální kolonizaci (Yoon et al., 2001). Současné

možnosti diagnostiky intraamniálního/fetálního zánětu jsou uvedeny v kapitole 6.

5.4.2. Uteroplacentární ischemie a deciduální hemorrhagie

Problematika účasti uteroplacentární ischemie a deciduální hemorrhagie v etiopatogenezi předčasného porodu představuje poměrně nově studovanou oblast. Oba procesy mohou mít konkrétního společného jmenovatele a tím jsou především trombofilie – vrozené či získané poruchy srážlivosti. První práci zabývající se tímto tématem publikoval opět tým profesora Romera (Arias et al., 1998). Z dalších studií v poslední době přibývají důkazy o vztahu mezi trombofiliemi a předčasným porodem. Při kongenitálních (trombofilní mutace) či získaných (zejména antifosfolipidový syndrom) trombofilních stavech předpokládáme nadměrnou koagulační aktivitu, která může ovlivnit rychle se rozvíjející mikrocirkulaci na úrovni placenty . Předpokládaným mechanismem je nadměrná generace trombinu, jejímž důsledkem je buď vznik mikrotrombů v placentárních cévách, rozvoj ischemie a dále pak oxidativního stresu, nebo naopak, vznik deciduální hemorrhagie, která může vyústit až v předčasné odloučení placenty. Nadměrná lokální generace trombinu v uteroplacentárním řečišti může souviset nejen s trombofiliemi, ale může se jednat i o důsledek vyšší tvorby tkáňového faktoru v rámci dysregulace zánětlivého procesu, jako odpověď na přítomnost infekce. Histologická vyšetření placent po porodu, kdy došlo k jejímu odloučení (abrupce placenty), často přináší důkaz o proběhlém zánětu (Darby et al., 1989). Oxidativní stres, který může vzniknout v rámci reperfučního poškození kyslíkem po proběhlé hypoxii , hraje důležitou roli v „ischemické kaskádě“. Předpokládáme aktivaci PRR produkty oxidativního stresu (DAMPs), jak je uvedeno výše (Gill et al., 2010). Přesný mechanismus však dosud není popsán. Jiným možným vysvětlením, jak nadměrná generace trombinu ovlivňuje předčasný porod, je jednak jeho přímá stimulace děložní kontraktility, jednak aktivace PARs - protease-activated receptors . Tyto jsou exprimovány nejen na trombocytech, ale také endoteliálními buňkami. Trombin patří mezi ligandy PARs, jejich aktivace mj. přispívá k zánětlivé odpovědi (Lockwood et al., 2005). Z trombofilií představují nejvýznamnější Leidenská mutace, mutace koagulačního faktoru II - protrombinu, deficit antitrombinu, proteinů C a S, dále pak antifosfolipidový syndrom. Uvedené poruchy srážlivosti hrají roli i v dalších patologických stavech v těhotenství, jako jsou tromboembolie, intrauterinní úmrtí plodu, intrauterinní růstová restrikce (IUGR), abrupce placenty, těžká preeklampsie a opakované spontánní potraty (Carbone et al., 2010). Donedávna nebyla považována za významnou tzv. mutace MTHFR. Současné práce ukazují, že i tato porucha metabolismu kyseliny listové může být spojena, pravděpodobně v kombinaci s dalšími faktory, s předčasným porodem. Metabolickou přeměnou vzniká z kyseliny listové aktivní vitamín – 5-methyltetrahydrofolát (5-THF, metafolin). Jedním z

klíčových enzymů, který vytváří tento hlavní biologicky účinný folát je právě methyltetrahydrofolátreduktáza (MTHFR). Tento enzym je u lidí kódován MTHFR genem. Gen pro MTHFR je umístěn na chromozomu 1 a dosud je známo již více jak 25 polymorfismů tohoto genu, tj. sekvenčních variant DNA. Nejvýznamnější je především mutace MTHFR C677T. Normální bází přítomnou na této pozici chromozomu je cytosin (C), v rámci mutace je přítomen thymin (T). Normální situace je tedy homozygotní konstituce 677 CC. Mutace genu , ať už v hetero- či homozygotní konstituci (tj. 677 CT, 677 TT) , vede k narušení termostability enzymu MTHFR, jejíž důsledkem je jeho nižší aktivita . Pokud mají jedinci jen MTHFR-heterozygotní konstituci (677 CT), mají jen lehce sníženou aktivitu enzymu MTHFR, což při normálním příjmu folátů nemusí mít žádné klinické důsledky. Pokud mají kompletní homozygotní konstituci mutace (677 TT), vzniká již závažnější porucha enzymu, jejímž důsledkem může být vyšší hladina homocysteinu. Dosavadní výzkum však ukázal, že toto platí jen při nízkém příjmu folátů a jejich nízké hladině v plasmě. Na druhou stranu, nemáme k dispozici žádné přesné údaje o tom, jaká hladina 5-methyl – THF je dostatečná ke katalyzování methioninsyntetázy a tedy chybí i informace o tom, při jakém snížení hladin 5-methyl – THF může dojít k hromadění toxického homocysteinu. Nejnověji se ukazuje, že 5-methyl – THF přímo ovlivňuje NO-syntázu a jeho nedostatek, bez ohledu na hladiny homocysteinu, může vést k ovlivnění produkce oxidu dusnatého (NO) endotelovými buňkami , s možnými důsledky na mikrocirkulaci (Antoniades et al., 2009) . Tato oblast je nyní intenzivně studována, i zde však stojíme teprve na počátku získávání poznatků. O vztahu absolutního (karence listové kyseliny) či relativního (vyšší potřeba v těhotenství, mutace MTHFR) nedostatečného příjmu folátů a předčasného porodu již bylo publikováno několik prací . Obecně platí, že v těhotenství se zvyšuje potřeba listové kyseliny na dvoj- až trojnásobek. Relativní nedostatek kyseliny listové v těhotenství, umocněný poruchou jejího zpracování při MTHFR mutacích, s sebou může nést nejen negativní důsledky stran vrozených vad neurální trubice, ale i dalších patologických stavů – například předčasného porodu. Lze jen přepokládat, že se může jednat o důsudek snížení hladiny 5- methyl-THF a tedy i snížení koncentrací NO, což může vést k narušení mikrocirkulace na úrovni placenty s rozvojem uteroplacentární ischémie. Závěry jednoho z největších výzkumných projektů byly publikovány v r.2009 , kdy bylo v kohortové studii hodnoceno prospektivně bezmála 35 000 žen s různě dlouhou dobou užívání folátů před početím, studijní soubor zahrnoval kontrolní skupinu žen, které žádnou prekoncepční suplementaci neměly. Foláty se ve studii rozumělo užívání jak listové kyseliny, tak i aktivního metabolitu – 5-methyl-THF. Teoretickým předpokladem a zároveň nulovou hypotézou v dané práci bylo , že nízká plasmatická koncentrace folátů je spojena s předčasným porodem. Uvedené odráží údaje uváděné v předcházejících článcích, kdy lze předpokládat, že při vyšší potřebě folátů v

těhotenství může vznikat jejich snížená hladina v plasmě jako projev relativního nedostatku těchto vitamínů. V práci bylo zjištěno, že pokud žena užívá foláty v rámci prekoncepční suplementace více jak jeden rok a pokračuje v jejich užívání dále v těhotenství, riziko předčasného porodu před 28.týdnem je proti „neuživatelkám“ o 70 % nižší a před 32.týdnem o 50% nižší. Nebyl však pozorován žádný užitek při užívání folátů před početím kratším než rok. Stejně tak nebylo pozorováno snížení incidence předčasného porodu po 32.týdnu byť při dlouhé době užívání před početím více jak rok. Přestože se zatím jednalo o jedinou takto rozsáhlou práci, lze zatím říci, že prekoncepční suplementace delší jak rok se může podílet na snížení rizika předčasného porodu, nicméně dosud není jasné, jak dlouho by ženy měly pokračovat v užívání folátů dále v těhotenství (Bukowski et al., 2009) . Máme k dispozici důkazy o vztahu absolutního (nedostatečný přívod) či relativního (MTHFR) nedostatku kyseliny listové a vrozených vad plodu. Zvýšení koncentrace „toxického“ homocysteinu v těle je považováno za jednu z hlavních příčin vzniku vrozených vad neurální trubice a srdce (Werler, 1993) .Významným rizikovým faktorem, který může podpořit rozvoj uteroplacentární ischemie, je kouření cigaret, resp. vazokonstrikční působení nikotinu ve vdechovaném kouři. (viz kapitola 3.1.4)

Jak je uvedeno v kapitole 3.3.1 , krvácení v těhotenství je obecně nespecificky spojeno s vyšším rizikem předčasného porodu. Krvácení z rodidel má relativně často původ v deciduální hemorrhagii (nadměrná generace trombinu) a možné souvislosti jsou popsány v této kapitole výše. U žen s předčasným porodem jsou ale také nalézány častěji vaskulární anomálie na úrovni placenty, jejichž přítomnost může být spojena s rizikem krvácení do choriodeciduálního prostoru (Arias et al., 1993).

5.4.3. Abnormální působení progesteronu

Progesteron je nejvýznamnější hormon v „udržení“ těhotenství. V kapitole o společné dráze předčasného i termínového porodu je popsána úloha progesteronu produkovaného placentou v rámci fyziologie. Z in vitro i in vivo důkazů vyplývá, že inhibuje děložní kontraktilitu, ovlivňuje i remodelaci děložní hrdla i aktivaci plodových obalů. Přesný vztah hladin progesteronu a regulace počtu jeho receptorů k počátku porodu (ať už předčasného či termínového) dosud není znám. (viz kapitola 5.2.1.2) Paradoxně, až práce, které se zabývaly se podáváním gestagenů v prevenci předčasného porodu, pomohly částečně osvětlit mechanismus jejich působení v těhotenství .První zprávy o vztahu aditivního podávání gestagenů těhotným k tzv. sekundární prevenci předčasného porodu jsou k dispozici z různých studií již z 60-80.let minulého století. Tyto studie zřejmě nebyly kvalitně postaveny, výsledky byly sporné a jejich závěry nebyly v praxi příliš využívány. Metaanalýza výzkumých prací v r. 1990 ukázala, že by gestageny mohly mít příznivý efekt

v snížení rizika předčasného porodu (Keirse, 1990). Opravdovým posunem v této oblasti byly až práce Meise, daFonseca a DeFranca, které ukázaly ve srovnání s placebem signifikantní pokles výskytu předčasného porodu při podávání gestagenů vaginálně či orálně (Meis et al., 2003, Da Fonseca et al., 2003, 2007, DeFranco et al., 2007). Studie měly klinický charakter, žádná z nich nedokázala spolehlivě osvětlit mechanismus působení dodávaných gestagenů. Nejnověji se jeví jako velmi nadějný výzkum vztahu působení gestagenů a zracích pochodů v děložním hrdle. Ze jedné zvířecí studie na březích myších vyplývá ovlivnění exprese některých genů gestageny, konkrétně medroxyprogesteronacetátem a progesteronem (Xu et al., 2008). Proteiny ze skupiny claudinů (24 různých druhů) patří, podobně jako výše uváděný connexin-43 (viz kapitola 5.2.1), mezi nejvýznamnější transmembránové molekuly mezibuněčných spojení – gap i tight junctions. Gap i tight junctions představují struktury, které zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci a podílí se na stabilizaci mezibuněčné integrity (Krause et al., 2008). Claudiny se tak mj. podílejí na vlastnostech epitelu. Abnormální exprese genů pro claudiny může vést např. ke změnám jeho permeability a tento proces se tedy může podílet na předčasné remodelaci – inkompetenci - děložního hrdla (Balkovetz et al., 2006). (viz kapitola 5.2.2) Z výše uvedené práce na zvířatech vyplynul závěr, že během předčasného i termínového porodu dochází ke snížení exprese genu pro claudin – 2 v epitelálních buňkách cervixu. Navíc přináší důkaz o „upregulaci“ genu pro claudin – 2 (zvýšení jeho exprese) po podání gestagenů. Další práce Timmonse - na březích myších - uvádí podobné výsledky, konkrétně diferencovanou expresi genů pro claudin – 1 a – 2 progesteronem. Přestože se v obou případech jedná o zvířecí modely, je možné říci, že se abnormální exprese genů pro claudiny může podílet na změnách permeability cervikálního epitelu a tedy i remodelaci děložního hrdla (Timmons et al., 2007). Obě práce podporují předpoklad, že podání gestagenů může být preventivním opatřením v případech rizika předčasného porodu. Všechny práce v této kapitole se snaží osvětlit působení aditivně dodávaného progesteronu, ale zatím nepřinášejí uspokojivé vysvětlení o přesném vztahu působení progesteronu či jeho receptorů a genů pro claudiny „in vivo“.

5.4.4. Porucha imunologické tolerance plodu matkou

Účast abnormálních imunologických pochodů v etiopatogenezi předčasného porodu je již řadu let studována. Jsou k dispozici četné důkazy (na molekulární i genetické úrovni), které podporují předpoklad, že předčasný porod a/nebo opakované potraty mohou probíhat na podkladě poruchy imunologické tolerance plodu matkou. Klasické transplantační teorie ale neposkytují přijatelné vysvětlení. V současnosti převažuje dále uváděná představa o imunologickém pozadí fyziologického těhotenství. V I. trimestru, v průběhu implantace blastocysty a formování placenty,

probíhá adaptace mateřského imunitního systému na přítomnost „semi-allogenního štěpu“, tj. těhotenství, které prezentuje otcovské antigeny na povrchu buněk trofoblastu. Invaze trofoblastu a kontakt s mateřskými cévami provází komplexní zánětlivá reakce matky, do které jsou z imunokompetentních buněk zapojeny především Th1-lymfocyty. Tato reakce je však za fyziologických podmínek limitována a je spojena pouze s odstraněním následků výše uvedených procesů, tj. probíhá především reparační tkání na straně matky. Druhý trimestr naopak představuje „protizánětlivou“ fázi, ve které hrají z imunokompetentních buněk důležitou roli především Th2-lymfocyty. Ve třetím trimestru fyziologického těhotenství hrají opět významnou roli Th1-lymfocyty, ale i další imunokompetentní buňky. Jejich influx do dělohy je spojen se zánětlivou reakcí, jejímž vyústěním je „odhojení štěpu“, tj. vypuzení plodu v termínu (Wegmann et al., 1992). Tento pozvolný proces je podkladem aktivace deciduy a plodových obalů, remodelace děložního hrdla a změn kontraktility myometria u fyziologického těhotenství, vyústění těchto dějů pak představuje porod plodu v termínu. Jak již bylo uvedeno, zatím však není známo, co přesně tyto mechanismy reguluje a jaký je posléze primární impuls k zahájení fyziologického porodu (Mor, 2007). Základním mechanismem tolerance plodu matkou je „křehká“ rovnováha downregulace a upregulace hlavních antigenů MHC systému (Major Histocompatibility Complex = hlavní histokompatibilní systém) (Szekers – Bartho, 2002). Zatímco jsou geny pro antigeny HLA-A a -B třídy I nejsou buňkami tzv. villózního trofoblastu (je v kontaktu s mateřskou krví) exprimovány, probíhá v trofoblastu exprese genů pro antigeny třídy HLA-G, které chrání plod před rozpoznáním mateřskou imunitou. Na druhou stranu, tzv. extravillózní trofoblast ,tj. ten, který není v kontaktu přímo s mateřskými cévami, MHC HLA antigeny I. třídy prezentuje. Tyto buňky mohou migrovat do mateřské části placenty, deciduy a zde být v kontaktu s imunitním systémem matky. Lze předpokládat, že vyšší průnik imunokompetentních buněk např. při selhání fyziologické transformace spirálních arterií v decidue a tedy narušení formování placenty může vést k abnormální imunologické odpovědi na straně matky. Představy o této problematice se nicméně teprve formují (Kovats et al., 1990, Schmidt, 1994, Guillard et al., 2008). Neadekvátní identifikace fetálních antigenů matkou, abnormální exprese genů u plodu a/nebo matky může vést k selhání „udržení“ těhotenství (Moffett-King, 2002, Lee et al., 2011). Celá řada dalších prací se zabývá mezičlánky imunitní odpovědi na různých úrovních . Ve studiích na zvířatech byla například zjištěna snížená exprese galectinu-1 (imunoregulační protein) u opakovaných fetálních ztrát (Blois et al., 2007, Than et al., 2008). Řada autoimunitních chorob je – při nekorigovanému průběhu - též spojena s vyšším rizikem předčasného porodu. Mezi nejčastější patří ulcerózní colitis, lupus erythematosus, imunopatologie štítné žlázy (protilátky proti tyreotropnímu receptoru - TRAK, protilátky proti TPO) aj. Přesné souvislosti ale zatím nejsou známy .

5.4.5. Alergie

Pro účast alergie v patofyziologii předčasného porodu svědčí několik důkazů vyplývajících z různých prací. Víme například, že děloha je bohatým zdrojem mastocytů – jedněch z „výkonných“ buněk alergické reakce. Farmakologická degranulace mastocytů vede indukci děložní činnosti, především vyplavením prostaglandinů (Garfield et al., 2000). V další práci je popisován výskyt eosinofilních granulocytů v plodové vodě získané od žen s předčasným porodem proti kontrolní skupině žen. Přítomnost eozinofilů podporuje přítomnost abnormální imunitní/alergické odpovědi jako jedné z cest vedoucí k předčasnému porodu, nicméně, zatím se nepodařilo nalézt antigen tuto reakci spouštějící (Bytautiene, 2004). Otázkou zůstává možná úloha antihistaminik v prevenci tohoto typu předčasného porodu.

5.4.6. Nadměrné rozpětí dělohy

Vrozené vady dělohy, polyhydramnion a vícečetná těhotenství jsou spojena s rizikem předčasného porodu. Intrauterinní tlak zůstává navzdory růstu dělohy relativně konstantní v průběhu celého těhotenství. Tento jev je připisován především působení progesteronu a endogenními „relaxátory“ myometria, především oxidu dusnatému (NO). Nadměrné rozpětí navozené výše uvedenými situacemi však vede ke zvýšení kontraktility myometria, uvolnění prostaglandinů, expresi genů pro proteiny gap junctions, především výše uvedeného Connexinu-43. Podobně dochází nadměrným rozpětím amniochoria k mechanickému narušení plodových obalů, které může vyústit v PPRM. Tato, relativně nejméně prozkoumaná, cesta k předčasnému porodu je zatím nejhůře ovlivnitelná.

5.4.7. Inkompetence děložního hrdla

Inkompetence děložního hrdla představuje porušení přirozené uzávěrové schopnosti děložního hrdla. Představuje jak jednu z etiopatogenetických spouštěcích příčin předčasného porodu, tak i jednu ze tří forem klinického obrazu předčasného porodu. (viz kapitola 4.1) Nejčastěji dochází k poruše bez jakýchkoliv klinických příznaků. Asymptomatická inkompetence děložního hrdla představuje závažný problém, v naprosté většině případů chybí varovné příznaky. Za fyziologických podmínek dochází v průběhu těhotenství k přirozeným a postupným změnám, které nazýváme zráním či remodelací děložního hrdla (viz kapitola 5.2.2) Za patologických podmínek, ať už vrozených či získaných, hovoříme o inkompetenci děložního hrdla. Chybění obtíží pacientky může vést k pozdní diagnóze. Čím kratší je délka děložního hrdla, tím pravděpodobněji se jedná o nevratnou situaci, směřující k potratu/předčasnému porodu. Tato diagnóza je spojena s druhotrimestrálními aborty i předčasným porodem, ale stejně tak pravděpodobně i s překotným

porodem v termínu. Mezi vrozené příčiny patří vzácná hypoplasie děložního čípku a expozice matky diethylstylbestrolem (DES) v rané fázi těhotenství. Získaná nedostatečnost je buď vázaná na období mimo těhotenství – v takovém případě má původ především v předchozím zákroku na čípku. Příkladem jsou konizace a opakované dilatace děložního hrdla spojené s ukončením těhotenství (viz kapitola 5.2.2). Další možnou příčinu nedostatečnosti děložního hrdla představuje intrauterinní infekce (MIAC). Jak je již zmíněno výše, vysoké procento žen s MIAC má současně inkompetenci děložního hrdla. (viz kapitola 5.4.1) Z těchto poznatků vyplývá i změna náhledu na využití stehu děložního hrdla – cerclage. Metaanalýza provedená Romerem měla za cíl zodpovědět otázku, jaká je úloha cerclage v sekundární prevenci předčasného porodu. Výsledky jeho práce nepřinesly spolehlivé důkazy o tom, že by rutinní provedení plánované cerclage děložního hrdla do cca 23.týdne těhotenství zlepšilo výsledky péče u žen s vysokým rizikem předčasného porodu vyplývajícím z anamnézy (předčasný porod či opakované potraty v anamnéze). Doporučuje selektivně indikovat k tomuto výkonu ženy, u nichž dochází k dynamickým změnám hodnot ultrazvukové cervikometrie a ženy s cervikální inkompetencí a současnou anamnézou předčasného porodu před 32.týdnem v předchozí graviditě. Pochybnosti však nadále přetrvávají i v této situaci vzhledem k vysoké incidenci MIAC. Do budoucna lze předpokládat, že rozhodnutí o indikaci k výkonu bude záležet na ověření přítomnosti MIAC. Případný průkaz subklinické infekce - MIAC - v porodních cestách představuje kontraindikaci k cerclage. MIAC je ale možno spolehlivě posoudit jen invazivním výkonem – amniocentézou a provedením kultivace plodové vody. Neinvazivní alternativu řešení inkompetence děložního hrdla přináší podávání gestagenů vaginálně, zmíněné výše, prognóza je však opět, vzhledem k vysoké incidenci MIAC, nejistá (Romero et al., 2008).

5.4.8. Mateřský a fetální stres

Mateřský stres exo- či endogenního původu je spojen s mírným rizikem předčasného porodu. Povaha stresu může být různá, ať už se jedná o vlivy psychické (deprese, úzkost) či fyzické – nadměrné pracovní vytížení. Přesný mechanismus, jakým stres ovlivňuje předčasný porod, zatím není znám, nicméně tím předpokládaným je působení CRH (je produkován během stresu), a to jak fetálního, mateřského či placentárního původu (Lockwood, 1990). CRH stimuluje syntézu prostaglandinů, MMP i syntézu DHEAS, jak bylo uvedeno v kapitole 5.2.6. Většina autorů se zatím shoduje, že stresové stimuly mohou stát za určitým procentem předčasných porodů, ale pravděpodobně jen těch, ke kterým dochází v blízkosti termínu porodu (Jones et al., 1990, Lockwood et al., 1990, 1999, Mastorakos et al., 2003, Li et al., 2005).

6. PREDIKCE PŘEDČASNÉHO PORODU A FETÁLNÍHO ZÁNĚTU

Výzkum je v této oblasti zaměřen na dva základní okruhy. První skupina výzkumných projektů se týká predikce předčasného porodu v běžné klinické praxi u žen, kterým hrozí jeho bezprostřední riziko. Druhou skupinu představuje výzkum nových metod, které mají za cíl odhalit intraamniální zánět/infekci – především fetální zánětlivou odpověď - FIRS - u hrozícího nebo již probíhajícího předčasného porodu. V obou skupinách je většina výzkumných projektů zaměřena na hledání nových biochemických parametrů předčasného porodu a fetální zánětlivé odpovědi, tzv. biomarkerů. Biomarker je objektivně hodnotitelný a měřitelný proteinový indikátor normálního biologického stavu, patologického procesu nebo odpovědi na farmakologickou či jinou lékařskou intervenci.

6.1. Predikce předčasného porodu – výsledky klinických studií

Výzkum je v této oblasti zaměřen především na takové ukazatele, které odráží skryté (dosud ne klinicky zjevné) procesy, vedoucí k předčasnému porodu. Cílem různých studií je zjistit, do jaké míry je možné odhalit změny, provázející aktivaci jednotlivých komponent společné dráhy předčasného a termínového porodu. Nejlépe jsou v současnosti prozkoumány změny, které se týkají aktivace deciduy a plodových obalů a remodelace děložního hrdla. Z celé řady různých zkoumaných biochemických markerů, které by mohly pomoci odhalit hrozbu předčasného porodu, se v současné době uplatňuje v klinické praxi především jeden parametr – fetální fibronektin (fFN). Fetální fibronektin je glykoprotein, který je produkován trofoblastem a je normálně detekovatelný v cervikovaginální tekutině na počátku těhotenství. Je-li průběh těhotenství fyziologický, není po 24. týdnu těhotenství fFN v cervikovaginální tekutině přítomen. Jeho výskyt v děložním sekretu po 24. ukončeném týdnu může signalizovat hrozící předčasný porod . fFN se znovu objevuje v cervikálním sekretu, v rámci fyziologických změn v porodních cestách, po 36. týdnu těhotenství. Vyšetření je prováděno pomocí štětičky z poolu tekutiny v zadní klenbě poševní, výsledek je hodnocen zpravidla semikvantitativně. Určitá hranice (50 ng/mL) je stanovena jako „cut off“, podobně jako těhotenský test jsou dvě čárky na testovacím proužku chápány jako pozitivní výsledek, jedna jako negativní. Uvolňování fFN do choriodeciduálního prostoru (a následně do cervikovaginálního sekretu) je průvodním projevem aktivace deciduy a plodových obalů. Dosavadní výzkum v této oblasti ukázal , že má stanovení fFN především vysokou negativní predikční hodnotu. Pozitivní predikční hodnota stran předčasného porodu je relativně nízká (43-73 %). Dostupná data však ukazují , že je-li test negativní , je zde až 99,7% pravděpodobnost , že nedojde k předčasnému porodu do 14 dní a až 93% pravděpodobnost, že žena neporodí do 37.týdne

těhotenství (Daskalakis et al., 2000, Andersen, 2000). Nevýhodou je však poměrně vysoká cena vyšetření, která limituje jeho využití v širší klinické praxi. Dalším parametrem, který je testován v souvislosti s predikcí předčasného porodu, je deciduální insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1). Jedná se také o látku, která je uvolňována do oblasti choriodeciduálního prostoru v průběhu prvního trimestru, v dalších fázích těhotenství se její produkce dramaticky snižuje. Podobné platí pro její přítomnost v plodové vodě, maximum produkce je popisováno v druhém trimestru, i zde se hlaviny postupně směrem k termínu porodu snižují. IGFBP-1 je produkován decidou - endometriálními stromálními buňkami a jeho sekrece je dle dostupných informací regulována progesteronem, relaxinem, insulin-like growth factorem (IGF) a insulinem (Thrakill et al., 1990). Stanovení je podobné jako u fFN, tj. semikvantitativně stěrem z poševní klenby.. Podobně jako u fFN, řada studií potvrdila i u tohoto markeru relativně nízkou pozitivní predikční hodnotu předčasného porodu (přibližně 50%) Byla však také potvrzena poměrně vysoká negativní predikční hodnota (v různých studiích kolísá od 90 do 99%), což je pro případnou klinickou praxi velmi důležité. Díky této informaci je možné, v kontextu s klinickým stavem a níže uvedenou ultrazvukovou cervikometrií, omezit obvyklé kroky i náklady, které s sebou nese zajištění těhotných s hrozícím předčasným porodem, tj. především hospitalizace a podání tokolytik a kortikoidů k indukci plicní zralosti plodu (Tanir et al., 2009, Rahkonen et al., 2010). Jiným způsobem, jak hodnotit riziko předčasného porodu, je měření délky děložního hrdla ultrazvukovým vyšetřením vaginální sondou – cervikometrií. Touto metodou hodnotíme remodelaci děložního hrdla. Zkrácení děložního hrdla pod 25 mm zjištěné takto ultrazvukovou cervikometrií před 28.týdnem těhotenství s sebou nese vyšší pravděpodobnost předčasného porodu. Současné práce jsou zaměřeny hlavně na možnost kombinace obou zmiňovaných vyšetření, tj. hodnocení FFN a ultrazvukové cervikometrie v predikci předčasného porodu. Další studie jsou pak zaměřeny na hodnocení vybraných mateřských biochemických parametrů, především markerů zánětu a endotelové dysfunkce a jejich vztah k předčasnému porodu. Biochemické parametry jsou v těchto studiích hodnoceny i stran přítomnosti fetálního zánětu, proto bude souhrnně uvedeno v následující kapitole.

6.2. Predikce intraamniálního (fetálního) zánětu – výsledky klinických studií

Přítomnost intraamniálního zánětu/infekce může být spojena s fetální zánětlivou odpovědí (viz kapitola 5.4.1) Prenatálně je poměrně obtížné prokázat účast intraamniálního zánětu u hrozícího nebo již probíhajícího předčasného porodu. Cílem současného výzkumu je „přiblížit se“ kompartmentu plodu a zpřesnit diagnostiku intraamniální infekce/zánětu, jejíž přítomnost zásadním způsobem ovlivňuje následnou morbiditu dítěte. V běžné klinické praxi je zatím nejvíce využíván

v diagnostice zánětlivého procesu předčasného porodu stanovení krevního obrazu (počet leukocytů) a z biochemických vyšetření CRP. Elevace hodnot CRP či leukocytů nemusí být vždy spojena s přítomností infekce, jejich zvýšené hodnoty odrážejí přítomnost zánětu obecně, přítom infekce představuje jen jednu z možných příčin. Byla provedena řada studií, které hodnotily sensitivitu těchto testů v predikci intraamniálního zánětu/infekce. Sensitivita jak krevního obrazu, tak CRP, kolísala v různých pracích od 33 % do 100 %, CRP ji vykazuje vyšší (Sungawa et al., 2008, Kramer et al., 2009, Kayem et al., 2009). Je známo, že hodnoty počtu leukocytů jsou modifikovány podáním kortikoidů (kortikoidy snižují adhezenci neutrofilních granulocytů k cévní stěně , důsledkem jejich působení je vyplavení neutrofilních granulocytů do cévního řečiště). Můžeme posoudit i diferenciální rozpočet leukocytů . Přesnější informaci poskytuje stanovení tzv. immature/total indexu. Jedná se o poměr mezi počtem nezralých granulocytů a celkovým počtem granulocytů, můžeme tak odlišit zánět od ovlivnění krevního obrazu léčbou kortikoidy. Nevýhoda výše uvedených vyšetření je však zřejmá: jedná se o sérové biochemické markery a posuzují pouze případnou mateřskou zánětlivou odpověď, nemusí souviset s fetální zánětlivou odpovědí. Přesto výzkumné projekty v této oblasti nadále pokračují, s cílem hledat takové parametry, jejichž měnící se hladiny mohou odrážet skrytý zánětlivý proces vedoucí k předčasnému porodu i fetální zánětlivé odpovědi. Některé práce mají nadějně výsledky. Sorokin např. ve své práci na skupině těhotných s hrozícím předčasným porodem zjistil, že vzestup hladin mateřského interleukinu – 6 i CRP je spojen předčasným porodem před 32.týdnem těhotenství a dále i s rizikem některých neonatálních komplikací, zejména intraventrikulární hemorrhagie – IVH. IVH se vyskytuje častěji u dětí, které intrauterinně prodělaly fetální zánětlivou odpověď. V té samé studii však nebyl nalezen žádný vztah hladin MMP-9 k předčasnému porodu (Sorokin et al., 2010). Podobně ani další prospektivní studie Poona neprokázala žádný vztah mezi hladinami MMP-9 v prvním trimestru a následným předčasným porodem (Poon et al., 2009). Jiná prospektivní studie Kramera však prokázala, že zvýšené hladiny MMP-9 zjištěné při běžných odběrech krve ve druhém trimestru (24 – 26.týden) jsou spojeny s následným předčasným porodem (Kramer et al., 2009). Část studií je zaměřena na studium markerů endotelové dysfunkce a na vztah změn jejich hladin k předčasnému porodu a fetálnímu zánětu. Endotel má nezastupitelnou úlohu v regulaci funkce cévní stěny . Podílí se na regulaci cévního tonu, krevního tlaku, tkáňové perfuze a účastní se mnoha fyziologických procesů. Endotelové buňky pomocí různých mediátorů ovlivňují vazomotorickou činnost cév, rovnováhu koagulační kaskády , proces fibrinolýzy a regulují permeabilitu cév. Existuje mnoho faktorů, které endotel negativně ovlivňují . Endotelová dysfunkce (dle literatury se používá také pojem aktivace) je první fází poškození cévní stěny. Infekce je považována za jeden z možných spouštěcích mechanismů endotelové dysfunkce, a to buď primárně (vlastní

působení mikrobů) nebo sekundárně, následkem působení reaktivních forem kyslíku. Reaktivní formy kyslíku produkované stimulovanými neutrofilami (např. v důsledku působení mikrobů) mohou při dysregulaci zánětlivého procesu působit nejen proti mikroorganismům, ale také autoagresivně, proti vlastním tkáním. Výzkum endotelové dysfunkce a vývoj nových metod k jejímu hodnocení je aktuálním tématem řady oborů. V současné době se míra endotelové dysfunkce stanovuje pomocí biochemických markerů, některými instrumentálními metodami nebo jejich kombinací (Piřha et al., 2001) . Jeden ze studovaných biochemických parametrů endotelové dysfunkce představuje RAGE - receptor pro produkty pokročilé glykace – AGE (advanced glycation end products). AGE vznikají jako důsledek neenzymatické glykace proteinů v důsledku hyperglykémie. RAGE představuje molekulu ze superrodiny imunoglobulinů, jejíž ligandem jsou především AGE, mezi jeho ligandy a dále uváděného sRAGE patří mj. i endogenní produkty poškození tkání – DAMPs, především S100 proteiny a HMGB – 1 . Nově se nyní RAGE řadí mezi PRR. RAGE se vyskytuje v solubilní formě (sRAGE) a formě transmembránové (RAGE). RAGE je exprimován na povrchu řady buněk (makrofágy, monocyty, endoteliální buňky aj.). Po interakci AGEs či výše uvedených dalších ligandů s transmembránovým receptorem RAGE je spuštěna signální kaskáda zahrnující p21^{ras} , MAP-kinázu a následuje aktivace nukleárního faktoru kappaB. Po jeho aktivaci dochází ke stimulaci transkripce genů pro cytokiny a růstové faktory. Sérová, solubilní forma RAGE - sRAGE je studována v souvislosti s inhibicí zánětu. Vysoké koncentrace sRAGE mohou mít protektivní úlohu před rozvojem zánětu (Hájek et al., 2008, Buhimschi et al., 2008) . Naopak, nízké koncentrace sRAGE mohou být spojeny s předčasným porodem i fetální zánětlivou odpovědí (Buhimschi, Baumbusch, 2009) . I zde bude potřeba dalších studií k potvrzení úlohy sRAGE v možné etiopatogenezi předčasného porodu a případného využití v klinické praxi.

Přes velké množství prací, které se touto problematikou zabývají - a určité nadějně výsledky, se zatím nedaří spolehlivě prokázat fetální zánětlivou odpověď neinvazivním způsobem, tj. pomocí hodnocení různých markerů zánětu a endotelové dysfunkce ze séra matky (Asrat, 2001) . Výzkum FIRS je tedy v současnosti zaměřen i na hodnocení markerů zánětu z plodové vody.

Nejvyšší sensitivitu v rámci experimentu představuje stanovení hladin prozánětlivých cytokinů (především interleukinu-6, 8 a 18) a matrixmetalloproteináz (především MMP – 8) z plodové vody. Vzorok plodové vody jsou v experimentu získávány pomocí odběru plodové vody – amniocentézy. Nevýhodou je invazivita vyšetření, nejen stran vlastního rizika PPROM krátce po výkonu, ale i stran dyskomfortu pro pacientku. Jak je již uvedeno dříve, elevace interleukinu-6 a MMP-8 v plodové vodě vypovídá o probíhající intraamniální infekci/zánětu lépe, než prostá

kultivace plodové vody (Harirah et al., 2002, Lee et al., 2007, Vaisbuch et al., 2010) . Stanovení MMP-8 je u předčasného porodu k dispozici ve formě „bedside“ testu k hodnocení probíhajícího intraamniálního zánětu. „Bedside“ test představuje rychlé semikvantitativní hodnocení přítomnosti sledovaného parametru. „Bedside“ test pro stanovení MMP – 8 již byl vyzkoušen pro stanovení přítomnosti intraamniálního zánětu při předčasném odtoku plodové vody – PPRM (Park et al., 2007) . Zatím ale není žádný z výše uvedených markerů zánětu využíván v běžné klinické praxi. Další možnost výzkumu , do blízké budoucnosti, představuje proteomická a metabolická analýza plodové vody (Romero, Espinoza, Gotsch et al., 2006, Buhimschi , Dulay et al., 2009) . Významnou oblast představuje i studium genetické predispozice k předčasnému porodu. (viz kapitola 3.1.1 a 5.4.1). Důležité je studium různých kandidátních genů, např. studium polymorfismu cytokinů, sRAGE, TLR (Romero , EspinozaJ, Gotsch et al. 2006) .

7. METODIKA STUDIE

Vyšetření byla prováděna na Gynekologicko-porodnické klinice VFN a 1.LF UK ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a také Ústavem patologie VFN a 1.LF UK

7.1. Hodnocení biochemických ukazatelů

Odběry krevních vzorků byly prováděny z kubitální vény těhotných a rodiček za standardních podmínek. Ve skupině žen s předčasným porodem byly navíc po porodu plodu - a jeho oddělení od matky - odebírány vzorky krve z umbilikální vény vycházející z placenty . Základní hematologické parametry (stanovení krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu neutrofilních granulocytů) byly stanoveny standardními metodami. Sérové koncentrace MMP , interleukinu-6 , -10 a sRAGE byly měřeny komerčními kity ELISA. (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA). Koncentrace MMP byly vyjádřeny v ng/ml , interleukinu-6 , -10 a sRAGE v pg/ml. Hladiny CRP byly hodnoceny metodou turbidimetrie a vyjádřeny v mg/ml.

7.2. Hodnocení histologie placenty a pupečníku

Po porodu byla placenta s pupečníkem a plodovými obaly odeslána v roztoku 10 % formaldehydu do Ústavu patologie VFN a 1.LF UK k histologickému vyšetření. Vyšetření se týkalo pouze skupiny žen s předčasným porodem. Byla hodnocena přítomnost zánětu plodových obalů, placenty a pupečníku – chorionamnionitis a funisitis, dle standardních kritérií, tj.především jejich infitrace neutrofilními granulocyty.

7.3 Statistická analýza dat

Vzhledem k non-Gaussovské distribuci dat u většiny měřených proměnných byly rozdíly hladin jednotlivých parametrů u žen s předčasným porodem a u kontrolní skupiny těhotných hodnoceny pomocí Mann-Whitneyho testu . Tento test byl použit jen pro porovnání hladin MMP-2,8,9, sRAGE and IL-10 v mateřském séru u žen s předčasným porodem a u kontrol, kdy byl medián gestačních týdnů stejný . V dalších hodnoceních se již medián gestačních týdnů mezi sledovanými skupinami lišil, proto byla místo Mann-Whitneyho testu použita analýza kovariance – ANCOVA - s gestačním týdnem (GA) jako kovariátou. Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programů NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA) pro Mann-Whitneyho test a pomocí programu Statgraphics Centurion (version XV, Statpoint Inc., Herndon, Virginia, USA) Jednotlivé parametry byly vyjádřeny jako medián \pm standardní odchylka

(SD). Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde p bylo menší než 0,05.

8. VLASTNÍ VÝSLEDKY

Vztah koncentrace MMP-2,8,9, sRAGE a IL-10 k předčasnému porodu a fetálnímu zánětu.

Hypotéza a cíl práce: Základním patogenetickým procesem předčasného porodu je zánět. Tento proces se týká matky i plodu. Zánětlivá odpověď plodu – FIRS – výrazně komplikuje dlouhodobou prognózu dětí. Cílem studie bylo popsat, jak souvisí změny koncentrací vybraných markerů zánětu a endotelové dysfunkce s předčasným porodem a fetální zánětlivou odpovědí.

První hypotéza práce byla následující: elevace vybraných matrixmetalloproteináz a interleukinu-10 a snížení hladiny sRAGE v mateřském séru jsou spojeny s předčasným porodem. Abychom mohli otestovat tuto hypotézu, porovnávali jsme koncentrace matrixmetalloproteináz - MMP-2,8,9, sRAGE a IL-10 v séru rodiček s předčasným porodem s hodnotami v séru těhotných kontrolní skupiny .

Druhá hypotéza byla následující: elevace vybraných matrixmetalloproteináz v mateřském a pupečnickovém séru, elevace interleukinu-10 v mateřském séru a snížení hladiny mateřského a fetálního (pupečnickového) sRAGE jsou spojeny s fetální zánětlivou odpovědí. K ověření této hypotézy bylo potřeba stanovit, jaký je ve skupině žen s předčasným porodem vztah koncentrace uvedených parametrů k zánětlivé odpovědi plodu.

Metodika:

Studie byla prováděna na Gynekologicko-porodnické klinice VFN a 1.LF UK ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a také Ústavem patologie VFN a 1.LF UK. Studijní soubor zahrnoval 105 žen, které byly rozděleny do dvou skupin. Studovaná skupina 1 zahrnovala 67 rodiček, u nichž byly krevní odběry prováděny v době předčasného porodu. Tyto pacientky představovaly jak ženy s kontrakcemi a zachovalou plodovou vodou, tak ženy s kontrakcemi a předchozím odtokem plodové vody (méně jak 12 hodin před začátkem porodu) . Skupina zahrnovala pacientky s předčasným porodem od 25. do 36.týdne těhotenství. Kontrolní skupina 2 obsahovala 38 těhotných v odpovídajících týdnech těhotenství a krevní odběr byl u nich jednorázově proveden v rámci prenatalní péče. Jednalo se o těhotné mezi 24. a 36.týdnem těhotenství, všechny nakonec porodily v termínu. Krevní odběry byly prováděny z kubitální žíly u skupiny 1 v době předčasného porodu, u skupiny 2 jednorázově v různých, výše uvedených týdnech, těhotenství, jako součást běžných krevních odběrů v těhotenství. V obou skupinách byly vyšetřovány ze séra matky následující parametry: MMP-2,8,9, IL-10, CRP a sRAGE. U skupiny 1

– tj.u žen s předčasným porodem - jsme po porodu plodu dále stanovovali hladiny IL-6, MMP-2,8,9 a sRAGE z umbilikální vény vycházející z placenty. Placenta, pupečník a plodové obaly byly odeslány k histologickému vyšetření k ověření případné zánětlivé odpovědi v pupečníku - funisitis. Všechny krevní vzorky byly centrifugovány při 1450g po dobu 10 minut. Séra byly skladovány při -80 °C a analyzovány v průběhu šesti měsíců po odběru.

Zánětlivá odpověď plodu byla hodnocena dle dvou kritérií: na základě elevací pupečnickových hladin IL-6 – biochemického korelátu fetální zánětlivé odpovědi nebo dle přítomnosti histologického průkazu zánětu v pupečníku – funisitis. Skupina 1 byla z těchto důvodů dále rozdělena na podskupiny A a B dle hladin IL-6 a také na další dvě podskupiny s a bez přítomnosti funisitis. Obě kritéria fetální zánětlivé odpovědi jsme posuzovali nezávisle, nehodnotili jsme rozdíly mezi podskupinami s a bez funisitis a podskupinami A a B. Hladiny IL-6 byly analyzovány pomocí ROC křivky a koncentrace vyšší než 23 pg/ml byly považovány za patognomické pro fetální zánětlivou odpověď - FIRS. Podskupina A (umbilikální IL-6 \leq 23 pg/ml) tak zahrnovala 34 pacientek a podskupina B (umbilikální IL-6 $>$ 23 pg/ml) 24 pacientek. 9 vzorků neobsahovalo dostatečné množství krve, a proto byly ze studie vyloučeny. Dalším kritériem rozdělení skupiny 1 byl výskyt funisitis, která představuje histologický korelát FIRS. (Tabulka 1) Funisitis byla diagnostikována dle přítomnosti infiltrace pupečnickových cév či Whartonova rosolu pupečníku neutrofilními granulocyty. Stáří těhotenství bylo vypočítáno podle data poslední menstruace a potvrzeno či korigováno dle ultrazvukového vyšetření plodu v I.trimestru. Vylučovacími kritérii pro studii byla infekce močových cest, systémové zánětlivé onemocnění, předchozí antibiotická léčba (v posledních třech týdnech), vícečetné těhotenství, imunokompromis a diabetes. Pacientky s klinickými a/nebo laboratorními známkami intraamniálního zánětu/infekce (tj. teplota matky více jak 38 °C, kombinující se nejméně s dvěma následujícími příznaky : tachykardie plodu či matky, zvýšený děložní tonus, zapáchající výtok z rodidel, elevace leukocytů nad 18×10^9 , zvýšené hodnoty CRP) , byly také do studie zařazeny. Studie byla provedena v souladu s principy Helsinské deklarace a schválena Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice. Všechny pacientky byly o účelu a postupu vyšetřování dobře informovány ústně i písemně a daly vědomý souhlas před vstupem do studie .

Tabulka 1

Studijní soubor a rozdělení pacientek do podskupin

<u>Studijní soubor</u>	<u>n = 105</u>
Skupina 1 – ženy s předčasným porodem	n = 67
Skupina 2 – těhotné kontrolní skupiny	n = 38
<u>Skupina 1 – ženy s předčasným porodem</u>	<u>n = 67</u>
podskupina s funisitis	n = 25
podskupina bez funisitis	n = 42
<u>Skupina 1 – ženy s předčasným porodem</u>	<u>n = 67</u>
Podskupina A : umbilical serum interleukin – 6 \leq 23	n = 34
Podskupina B: umbilical serum interleukin – 6 $>$ 23	n = 24
vyloučené vzorky	n = 9

Výsledky:

Porovnání mateřských sérových koncentrací MMP-2,8,9, IL-10 a sRAGE u žen s předčasným porodem (Skupina 1) a u těhotných kontrolní skupiny (Skupina 2)

Cílem bylo porovnat sérové koncentrace výše uvedených parametrů u žen s předčasným porodem a kontrolní skupinou těhotných . Pacientky s předčasným porodem měly významně nižší sérové koncentrace MMP-2 v porovnání s pacientkami kontrolní skupiny (141 ± 57 ng/ml vs. 203 ± 52 ng/ml, $p < 0.0001$).(Graf 1) Podobně jsme zjistili významně nižší sérové hladiny sRAGE a významně vyšší sérové hladiny MMP-9 a IL-10 u žen s předčasným porodem v porovnání s koncentracemi těchto paramterů u těhotných kontrolní skupiny. U koncentrací MMP-8 nebyly mezi oběma skupinami zaznamenány statisticky významné rozdíly. Medián gestačních týdnů byl u obou skupin stejný - 29.týden těhotenství. (Tabulka 2)

Tabulka 2

Hodnoty CRP, gestačního stáří, koncentrací sRAGE-M, porodní váhy, IL10-M, MMP2-M, MMP8-M, MMP9-M, u žen předčasným porodem (Skupina 1) a kontrolní skupiny těhotných (Skupina 2)

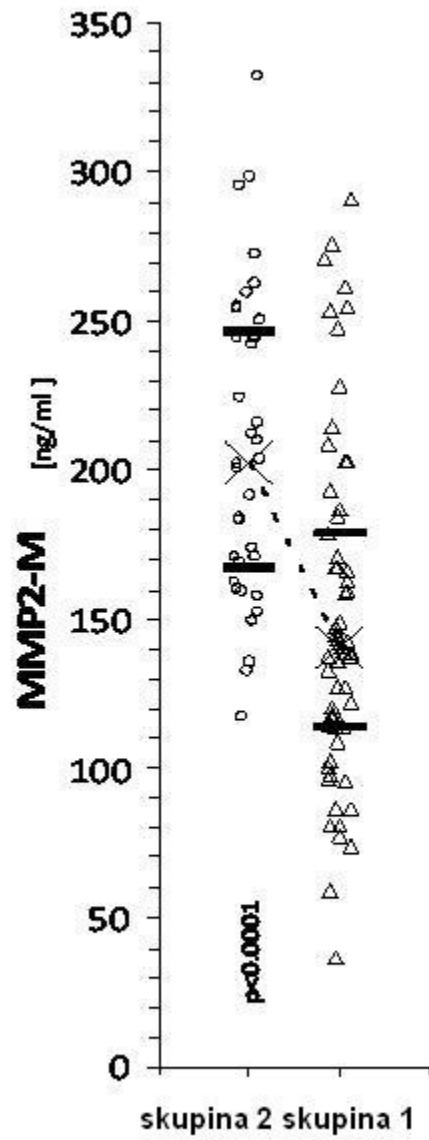
Proměnná	Předčasný porod - Skupina 1						Kontrolní soubor – Skupina 2						Statistická významnost (Mann-Whitney test)
	Kvartily						Kvartily						
	n	průměr	SD	medián	dolní	vrchní	n	průměr	SD	medián	dolní	vrchní	
CRP	67	24,5	30,4	11,5	5,0	32,3	38	3,55	2,32	2,00	2,00	4,75	p<0.0001
Gestační týden	67	29,3	3,3	29,0	26,0	32,0	38	29,5	4,1	29,0	26,0	32,0	NS
sRAGE-M	67	705	497	581	381	822	38	803	337	735	540	962	p<0.04
Porodní váha	67	1472	647	1300	940	1905	38	3214	593,2	3220	2930	3700	p<0.0001
IL10-M	67	24,1	44,2	6,9	3,3	14,2	38	7,92	21,88	3,99	1,27	6,18	p<0.003
MMP2-M	67	150	57	141	114	179	38	208	52	203	167	246	p<0.0001
MMP8-M	67	79	78	53	28	103	38	52,1	28,4	49,7	31,1	67,0	NS
MMP9-M	67	1532	788	1521	948	1912	38	1124	440	1113	764	1379	p<0.008

*Mann-Whitney test

CRP : C-reaktivní protein (mg/ml) , sRAGE-M: mateřské sérové koncentrace sRAGE (pg/ml) , IL10-M: mateřské sérové koncentrace interleukinu-10 (pg/ml), MMP-2,-8,-9-M: mateřské sérové koncentrace MMPs (ng/ml), porodní váha v gramech, Gestační týden - dokončený týden těhotenství.

Graf 1

Analýza mateřských sérových koncentrací MMP-2 (MMP2-M, ng/ml) u žen s předčasným porodem (skupina 1) a kontrolní skupinou těhotných (skupina 2).



Vztah mateřských sérových koncentrací CRP, MMP-2,-8,-9, IL-10 a sRAGE a fetálních (pupečnickových) koncentrací MMP-2,-8,-9, interleukinu-6 a sRAGE k výskytu funisitis.

U žen s předčasným porodem jsme porovnávali hladiny studovaných parametrů v podskupinách s a bez funisitis. Abychom vyloučili vliv gestačního stáří na koncentrace sledovaných parametrů, byly hodnoty upraveny dle gestačního stáří (ANCOVA). (Tabulka 3) V podskupině žen s funisitis byly významně nižší hladiny mateřského MMP-2 (124 ± 50 ng/ml, $p < 0,002$) proti podskupině žen bez funisitis (159 ± 57 ng/ml). Dále jsme zjistili významně vyšší hladiny mateřského interleukinu – 6 ve skupině žen s funisitis. Ve skupině žen s funisitis byly dále zjištěny signifikantně vyšší hladiny mateřského sérového CRP . Porovnáním ostatních parametrů nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

Tabulka 3

Hodnoty CRP, gestačního stáří, sRAGE-M, sRAGE-U, IL6-U, porodní váhy, IL10-M, MMP2-M, MMP8-M, MMP9-M, MMP2-U, MMP8-U, MMP9-U u žen s předčasným porodem a následně diagnostikovanou funisitis, upravené dle gestačního stáří (GA)

Proměnná	Podskupina bez funisitis						Podskupina s funisitis						Statistická významnost (upraveno dle gestačního stáří - ANCOVA)
	Kvartily						Kvartily						
	n	průměr	SD	medián	dolní	vrchní	n	průměr	SD	medián	dolní	vrchní	
CRP	42	18,3	26,4	8,0	3,0	21,0	25	34,60	34,07	26,00	8,00	59,00	GA: p<0.006
Gestační týden	42	29,9	3,3	30,0	27,3	32,8	25	28,4	3,1	28,0	26,0	30,0	p<0.02*
sRAGE-M	42	743	562	580	391	901	25	650	383	583	377	818	GA: NS
sRAGE-U	42	3098	1649	2679	2064	4395	25	2059	1429	1545	814	3339	GA: NS
IL6-U	42	52	113	7	4	27	25	257,1	276,5	210,3	11,8	300,0	GA: p<0.002
Porodní váha	42	1571	650	1423	983	2038	25	1306	619,4	1000	930	1620	GA: p<0.0001
IL10-M	42	16,6	34,2	5,3	3,3	10,7	25	35,90	55,22	8,31	3,99	44,45	GA: NS
MMP2-M	42	165	57	159	122	204	25	127	50	124	100	146	GA: p<0.002
MMP8-M	42	66	69	46	22	71	25	100,0	88,1	82,5	32,2	124,9	GA: p<0.05
MMP9-M	42	1421	846	1286	815	1866	25	1705	670	1598	1328	1989	GA: NS
MMP2-U	42	379	74	371	329	431	25	307,5	63,36	316,5	248,9	356,8	GA: NS
MMP8-U	42	10,3	24,5	3,3	1,8	6,2	25	33,76	49,01	13,5	5,7	41,9	GA: NS
MMP9-U	42	180	165	127	83	198	25	375,9	751,8	145	61,5	310,5	GA: NS

*Mann-Whitney test

CRP – C-reaktivní protein (mg/ml), sRAGE-M – mateřské sérové koncentrace sRAGE (pg/ml), sRAGE-U – pupečnickové (fetální) sérové koncentrace sRAGE (pg/ml), MMP2,8,9-M – mateřské sérové koncentrace MMPs (ng/ml), MMP2,8,9-U – pupečnickové (fetální) sérové koncentrace MMPs (ng/ml), porodní váha v gramech, IL-6U – pupečnickové (fetální) sérové koncentrace interleukin-6 (pg/ml), IL10-M – mateřské sérové koncentrace interleukinu-10 (pg/ml), Gestační týden – dokončený týden těhotenství.

Vztah mateřských sérových koncentrací CRP, MMP-2,-8,-9, IL-10 a sRAGE a fetálních (pupečnickových) koncentrací MMP-2,-8,-9 a sRAGE k přítomnosti fetální zánětlivé odpovědi.

Pomocí ROC křivky byla stanovena koncentrace interleukinu – 6 v pupečnickové krvi 23 pg/ml a vyšší jako patognomická pro fetální zánětlivou odpověď – FIRS. Byly porovnávány koncentrace jednotlivých studovaných parametrů v obou podskupinách žen s předčasným porodem, tj. v podskupině s koncentrací interleukinu-6 z pupečnickové krve ≤ 23 pg/ml (podskupina A) a podskupině s koncentrací interleukinu-6 > 23 pg/ml a tedy s přítomností fetální zánětlivé odpovědi (podskupina B). Mediány gestačního stáří v obou skupinách byly rozdílné. Abychom vyloučili vliv gestačního stáří na koncentrace sledovaných parametrů, byly hodnoty upraveny dle gestačního stáří. (ANCOVA) (Tabulka 4) Naměřili jsme významně nižší mateřské sérové koncentrace MMP-2 v podskupině B (117 ± 37 ng/ml, $p < 0,05$) v porovnání s koncentracemi v podskupině A (164 ± 61 ng/ml). (Graf 2) Dále jsem zjistili, že mateřské koncentrace MMP-8 a CRP jsou v podskupině B významně vyšší ve srovnání s koncentracemi v podskupině A. U ostatních biochemických parametrů nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly.

Tabulka 4

Hodnoty CRP , gestačního stáří, sRAGE-M, sRAGE-U, IL6-U, porodní váhy, IL10-M, MMP2-M, MMP8-M, MMP9-M, MMP2-U, MMP8-U, MMP9-U u žen s nízkými a zvýšenými hladinami fetálního (pupečnickového) interleukinu-6 (podskupiny A a B), upravené dle gestačního stáří (GA)

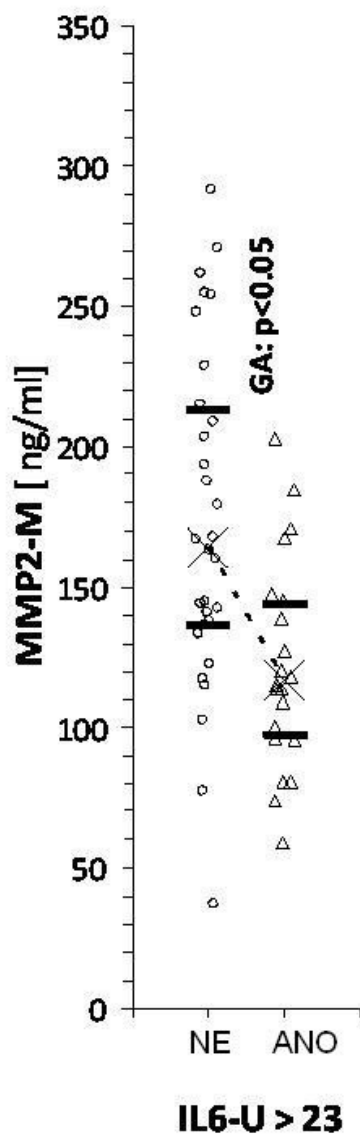
Proměnná	Podskupina A :IL6-U ≤ 23						Podskupina B: IL6-U > 23						Statistická významnost (upraveno dle gestačního stáří - ANCOVA)
	n	Kvartily					n	Kvartily					
		průměr	SD	medián	dolní	vrchní		průměr	SD	medián	dolní	vrchní	
CRP	34	11,4	13,9	7,0	2,3	12,0	24	42,00	38,75	30,00	12,50	53,50	GA: p<0.03
Gestační týden	34	30,6	3,1	31,0	28,0	33,0	24	27,5	2,4	27,5	25,8	29,0	p<0.0003 *
sRAGE-M	34	801	602	672	393	975	24	658	396	548	387	799	GA: NS
sRAGE-U	34	2894	1579	2595	1940	4030	24	2333	1646	1746	871	3771	GA: NS
IL6-U	34	7	6	6	4	9	24	303,7	245,6	218,6	119,4	422,8	GA: NS
Porodní váha	34	1729	670	1633	1136	2348	24	1079	329	985	916,3	1251	GA: p<0.0001
IL10-M	34	6,1	5,9	4,7	2,4	7,4	24	51,61	63,09	12,67	6,71	80,56	GA: NS
MMP2-M	34	173	61	164	136	213	24	122	37	117	97	144	GA: p<0.05
MMP8-M	34	68	78	42	20	97	24	88,2	79,2	55,2	30,1	117,6	GA: p<0.02
MMP9-M	34	1291	822	1121	612	1872	24	1759	663	1681	1295	1921	GA: NS
MMP2-U	34	384	76	378	340	431	24	306,4	57,1	315,9	248,9	346,3	GA: NS
MMP8-U	34	5,6	8,3	3,0	1,8	4,6	24	32,64	48,5	10,5	5,7	38	GA: NS
MMP9-U	34	266	618	119	78	207	24	207,3	215	145	76	247	GA: NS

*Mann-Whitney test

CRP – C-reaktivní protein (mg/ml), sRAGE-M – mateřské sérové koncentrace sRAGE (pg/ml), sRAGE-U – pupečnickové (fetální) sérové koncentrace sRAGE (pg/ml), MMP2,8,9-M –mateřské sérové koncentrace MMPs (ng/ml), MMP2,8,9-U – pupečnickové (fetální) sérové koncentrace MMPs (ng/ml),porodní váha v gramech , IL-6U - pupečnickové (fetální) sérové koncentrace interleukin-6 (pg/ml), IL10-M - mateřské sérové koncentrace interleukinu-10 (pg/ml), Gestační týden - dokončený týden těhotenství.

Graf 2

Analýza mateřských sérových koncentrací MMP-2 (MMP2-M, ng/ml) ve vztahu k pupečnickovým koncentracím IL-6 (cut-off value 23 pg/ml) ve skupině žen s předčasným porodem (skupina 1). Hodnoty byly upraveny dle gestačního stáří. (GA).



Koncentrace IL6-U > 23 = fetální zánětlivá odpověď (podskupina B)

Koncentrace IL6-U ≤ 23 = bez fetální zánětlivé odpovědi. (podskupina A)

Závěr

Cílem řady soudobých výzkumných projektů je pokusit se najít vhodné biochemické parametry, které by upozornily na možné riziko předčasného porodu a fetální zánětlivé odpovědi. Nedávné objevy naznačují, že matrixmetalloproteinázy hrají důležitou roli v patofyziologii předčasného porodu i během porodu v termínu. sRAGE je podle posledních poznatků také zapojen do zánětlivého procesu předčasného porodu. V našem výzkumném projektu jsme ve skupině žen s předčasným porodem zjistili významně nižší mateřské sérové koncentrace MMP-2 a sRAGE proti koncentracím v kontrolní skupině nekomplikovaně těhotných žen v odpovídajících gestačních týdnech. Ve skupině žen s předčasným porodem jsme dále zjistili významně nižší mateřské sérové koncentrace MMP-2 u žen, u nichž byla následně po porodu prokázána fetální zánětlivá odpověď, ve srovnání se skupinou žen bez fetální zánětlivé odpovědi. Bude však potřeba dalších prací k osvětlení funkčního významu těchto nálezů.

Výsledky této práce byly publikovány v časopisu Journal of Perinatal Medicine, článek v původní otištěné verzi je přiložen v příloze této dizertační práce.

9.DISKUSE

Narůstající objem informací o patofyziologických mechanismech předčasného porodu umožňuje začlenit do jeho managementu nové diagnostické a terapeutické postupy. V patogenezi předčasného porodu hrají roli infekce, uteroplacentární ischemie, nadměrné rozpětí dělohy, abnormální působení progesteronu, alergie, porucha imunologické tolerance plodu matkou a mateřský a fetální stres, a to buď individuálně nebo se mohou vzájemně kombinovat. Všechny tyto mechanismy mohou vést k předčasné aktivaci společné dráhy předčasného a termínového porodu, tj. aktivaci deciduy a plodových obalů, změnám kontraktility myometria a remodelaci děložního hrdla. Celá řada prací přináší důkazy o tom, že jsou do těchto procesů zapojeny systémy realizující zánětovou odpověď organismu (Gomez et al., 1998, Buhimschi et al., 2006, Romero, Espinoza, Goncalves et al., 2006, Romero et al., 2007, Romero et al., 2008, Christiaens et al., 2008, Buhimschi, Baumbusch, et al., 2009). Tato odpověď se může týkat nejen matky - výše uvedených procesů - ale i plodu, pak se může rozvinout fetální zánětlivá odpověď. Lze předpokládat, že vlastní klinický obraz předčasného porodu, se kterým se máme možnost setkat v klinické praxi, je jen vyvrcholením dlouhodobě skrytě probíhajícího procesu. Zatím není k dispozici žádná metoda, která by umožnila primární prevenci předčasného porodu. Všechna opatření jsou tedy zaměřena na tzv.sekundární prevenci. Jejím cílem je časná diagnostika hrozícího předčasného porodu. V současné porodnické praxi jsou již k dispozici různé terapeutické modalitty, které umožňují tento proces oddálit či zcela zastavit. Pokud již předčasný porod probíhá (např. spontánní předčasný porod s kontrakcemi), je dalším cílem pokusit se co nejdříve vyhodnotit možnou zánětlivou odpověď plodu – FIRS. Pokud je tato již přítomna, stoupá riziko dlouhodobých komplikací u dítěte. V současnosti tedy probíhají dvě linie výzkumu předčasného porodu , jeho vlastní predikce a dále pak predikce fetální zánětlivé odpovědi.

V řadě prací byly studovány změny hladin různých biochemických markerů, které by pomohly upozornit na riziko předčasného porodu a fetální zánětlivé odpovědi, a to jak z mateřského séra, z cervikálního sekretu, z plodové vody i moči. Do naší studie jsme vybrali takové parametry, u nichž lze předpokládat, že se jejich koncentrace v průběhu zánětlivého procesu mohou měnit , ale přitom se nejedná o standardně využívané markery zánětu (s výjimkou CRP). Cílem této práce bylo nejen hodnocení vztahu těchto parametrů k předčasnému porodu a fetálnímu zánětu z hlediska možného využití v jejich predikci, ale pokusit se vyhodnotit možnou úlohu některých méně studovaných matrixmetalloproteináz a sRAGE v patogenezi předčasného porodu.

V první části studie jsme nejprve porovnávali koncentrace vybraných MMP, interleukinu-10 a sRAGE v mateřském séru u žen předčasným porodem a kontrolní skupinou žen rodících v termínu (skupina 1 a skupina 2). V části dizertační práce, kde se věnuji pozadí problému, je uvedeno, že

jsou matrixmetalloproteinázy zapojeny do všech tří komponent společné dráhy předčasného i termínového porodu, především do procesu aktivace deciduy a plodových obalů, ale také remodelace děložního hrdla a změn kontraktility dělohy. Lze přitom předpokládat, že všechny tyto pochody – tj. „příprava porodu“ (předčasného či termínového) a současně tedy změny hladiny matrixmetalloproteináz - probíhají minimálně v řádu dnů až týdnů. Do studie bylo z formálních důvodů zařazeno také hodnocení hladin markeru akutní fáze zánětu - CRP – toto vyšetření je součástí standardních biochemických odběrů u předčasného porodu. Jeho hladiny byly u žen s předčasným porodem v porovnání s koncentracemi u těhotných kontrol signifikantně vyšší. Elevace markerů akutní fáze zánětu v mateřském séru však provází již nevratnou fází předčasného porodu, která představuje vyvrcholení dosud skrytého chronického zánětového procesu. V takových případech již těhotné nereagují na terapeutické snahy o oddálení porodu pomocí tokolýzy (Torricelli et al., 2011) . Stejně tak ani negativní hladiny markerů akutní fáze zánětu však zcela nevylučují hrozící předčasný porod. Z těchto důvodů nelze využít standardní zánětlivé markery k predikci předčasného porodu (Kramer et al., 2009, Wei et al., 2010). Ve druhé části studie jsme však mateřské CRP studovali - společně s ostatními vybranými parametry - stran vztahu jeho hladin k fetální zánětlivé odpovědi, jak bude uvedeno dále. V současné době zkoumá řada výzkumných projektů takové biochemické parametry, u nichž se předpokládá, že se jejich hladiny se mohou měnit postupně a dlouhodobě . MMP-2 a -9 patří mezi gelatinázy, které se podílí svou gelatinolytickou aktivitou na degradaci extracelulární matrix amnia a choria a hrají jednu z klíčových úloh v procesu předčasného i termínového porodu. Během procesu aktivace deciduy a plodových obalů i během porodu produkují chorion a decidua MMP-2 a MMP-9, mesenchymové buňky amnia však produkují výhradně jen MMP-2 . (viz kapitola 5.3.3) Důležitou informací pro hodnocení hladin, případně aktivity a exprese, MMP v tělesných tekutinách a plodových obalech představuje fakt, že amnion nemá přímý kontakt s mateřskou cirkulací, jedná se o bezcévnou strukturu (Weiss et al., 2007) . Proti původním předpokladům (nulová hypotéza práce) jsme v naší studii nepotvrdili elevaci hladin všech matrixmetalloproteináz ve skupině žen s předčasným porodem proti kontrolní skupině těhotných. Naopak, ve skupině žen s předčasným porodem jsme našli signifikantně nižší hladiny MMP-2 proti kontrolní skupině žen. Dosavadní studie, které hodnotily vztah MMP-2 k těhotenství či předčasnému porodu, přinesly poměrně rozporuplné výsledky. Různé výsledky studií mohou být dány i rozdílnou metodikou, tj. tím, jaký typ vzorků byl studován. Výzkum byl dosud prováděn jak ze séra matky, z moči, plodové vody i z plodových obalů a placenty. V jedné z prací byla prokázána zvýšená aktivita MMP-2 v buňkách amnia od pacientek s PPRM proti kontrolní skupině vzorků amnia získaných z plánovaných císařských řezů se zachovalou plodovou vodou (Ota et al., 2006) . Jedním z možných vysvětlení rozdílných

výsledků uvedené a naší studie může být i to, že se v mateřském séru nemusí odrazit celková produkce MMP-2 během předčasného porodu. Jak již bylo uvedeno, buňky amnia, které na rozdíl od deciduy a choria produkují pouze MMP-2, nejsou v přímém kontaktu s mateřskou cirkulací. Lze tedy očekávat odlišné výsledky aktivity MMP-2 z mateřského séra a z amnia či plodové vody. (Xu et al., 2002). V naší práci jsme tedy vycházeli z předpokladu, že se v mateřském séru zobrazily jen hladiny MMP-2 i MMP-9 pocházející z deciduy a choria. Snížení hladin MMP-2 v mateřském séru proti kontrolní skupině těhotných (rodících v termínu) dosud neuváděla žádná práce, ale podobné výsledky již byly publikovány. V jedné studii byly vyšetřovány koncentrace MMP-2 v plodové vodě a byly shledány signifikantně nižší hladiny MMP-2 v plodové vodě ve skupině žen s předčasným porodem proti kontrolní skupině žen v odpovídajících týdnech těhotenství, u kterých byla plodová voda odebírána z genetické indikace a které nakonec porodily v termínu (Maymon et al., 2000). Naše výsledky dále ukázaly signifikantně vyšší hladiny mateřského MMP – 9 ve skupině žen s předčasným porodem proti kontrolnímu souboru . Stejný závěr již prezentovala práce Makrakise, podobný pak práce Maymona, který studoval hladiny MMP-9 v plodové vodě (Maymon et al., 2000 , Makrakis et al., 2003). Ačkoliv patří MMP-2 a MMP-9 mezi gelatinázy, je jejich regulace pravděpodobně rozdílná. MMP-2 byla donedávna považována za „konstitutivní“ (neměnné hladiny), hladiny MMP-9 více podléhají regulačním vlivům . Snížení hladin MMP-2 u žen s předčasným porodem proti kontrolní skupině těhotných v našem výzkumném projektu je proto poměrně překvapivé. Jak již bylo uvedeno, produkce matrixmetalloproteináz je ovlivňována na různých úrovních. (viz kapitola 5.3.3) Přesné pochopení mechanismu řízení jejich tvorby komplikuje fakt, že jsou MMP zapojeny jak do fyziologických, tak i patologických procesů . Naprostá většina autorů, které hodnotí hladiny MMP-9 během předčasného a termínového porodu, se shoduje na tom, že je její elevace důsledkem zánětlivé „kaskády“ (Fortunato et al., 1997, Watari et al., 1999, Choi et al., 2009). O regulaci MMP-2 během porodu zatím není k dispozici mnoho informací. Dosavadní údaje však naznačují, že může být MMP-2 regulována jinak na úrovni deciduy a choria a jinak na úrovni amnia (Maymon et al., 2001, Goldman et al., 2007). Abychom se mohli pokusit vysvětlit možné důvody významného snížení hladin MMP-2 u předčasného porodu v naší studii, uvedu výsledky výzkumných projektů, které hodnotily vztah MMP-2 ke dvěma klíčovými faktorům provázející předčasný a termínový porod, tj. působení progesteronu a přítomnost zánětlivého procesu. Studie na krysách s experimentálně navozeným diabetem a zdravých kontrolách měla za cíl porovnat gelatinolytickou aktivitu MMP-2 v cílových tkání (periodontium), v obou skupinách po zánětlivém stimulu . Ve skupině zvířat s diabetem bylo pozorováno snížení aktivity MMP-2 a zvýšení aktivity MMP-9 proti zdravým kontrolám . Dále byla zjištěna snížená exprese MMP-2 po

zánětlivém stimulu v obou skupinách – tj. jak u diabetických, tak u zdravých krys (Silva et al., 2008). Další dvě práce na tkáňových kulturách ukázaly snížení exprese MMP-2 po navození oxidativního stresu. (Alge-Priglinger et al., 2009, Li et al., 2011) Oxidativní stres může provázet zánětlivý proces. (Gill et al., 2010) (viz kapitola 5.3.1) Jednalo se sice o studie na zvířatech a tkáňových kulturách, v jednom případě pak při diabetických podmínkách, nicméně výsledky naznačují, že zánětlivý proces a/nebo oxidativní stres může stát - za určitých podmínek - za snížením exprese a/nebo aktivity MMP-2. Některé práce se věnují vztahu působení progesteronu a MMP. Progesteron je důležitým hormonem, zodpovědným za udržení klidového napětí děložní svaloviny. Snížení působení progesteronu je všeobecně považováno za jeden ze spouštěcích mechanismů počátku předčasného i termínového porodu. (Mendelson, 2009) . Jedna studie zkoumala vliv podávaného progesteronu na expresi MMP-2 v tkáňových kulturách získaných od termínových těhotných rodičů spontánně a císařským řezem. Autoři zjistili, že je po podání progesteronu inhibována exprese MMP-2 jen v decidue a jen před začátkem děložních kontrakcí, tj. ve vzorcích tkání získaných od žen rodičů plánovaným císařským řezem. V amniu zůstala před počátkem kontrakcí po podání progesteronu exprese MMP-2 stejná jako před jeho podáním. Stejně tak se exprese MMP-2 v amniu nezměnila po podání progesteronu ze vzorků tkání získaných po začátku kontrakcí. Výsledky práce podporují předpoklad, že je exprese MMP-2 regulována jinak na úrovni deciduy a jinak na úrovni amnia, což již dříve prokázal Goldman (Goldman et al., 2007) . Naš výzkum zjistil snížení MMP – 2 u předčasném porodu v mateřském séru (tedy pravděpodobně choriodeciduálního původu, viz výše) proti kontrolní skupině žen, přitom z dosud publikovaných údajů vyplývá, že lze předpokládat v počátku porodu snížení působení progesteronu, pravděpodobně cestou ovlivnění progesteronových receptorů. Přesný vztah iniciačních mechanismů předčasného či termínového porodu a působení progesteronu a jeho receptorů však zatím není znám (viz kapitola 5.2.1.2) Naše poznatky naznačují možné abnormální regulační mechanismy exprese jednoho z důležitých enzymů - MMP-2 - v procesu předčasného porodu. Klíčem k pochopení funkce MMP v těhotenství - a zvláště u předčasného porodu - bude přesný popis regulace jejich exprese i ovlivnění enzymatické aktivity. Bude potřeba dalšího výzkumu k zjištění přesných souvislostí.

Na rozdíl od jiných studií jsme neprokázali signifikantní rozdíly v hladinách mateřské sérové MMP – 8 mezi skupinou žen s předčasným porodem a kontrolním souborem. Většina prací ale zkoumala hladiny MMP – 8 v plodové vodě. MMP-8 je zapojena do mechanismu intraamniálního zánětu a následného předčasného porodu. (Biggio et al., 2005, Kim et al., 2007, Park et al., 2008) . Dále jsme zjistili elevaci hladin interleukinu – 10 u žen s předčasným porodem proti kontrolní skupině těhotných. Podobné výsledky ukazuje studie, ve které byly vyšetřovány hladiny interleukinu – 10 v

plodové vodě . V práci, která porovnávala hladiny interleukinu – 10 v plodové vodě žen s předčasným a termínovým porodem s kontrolní skupinou těhotných v odpovídajících týdnech těhotenství, bylo zjištěno, že jsou hladiny tohoto cytokinu v plodové vodě významně vyšší v průběhu porodu ve srovnání s hladinami u kontrolní skupiny těhotných. Dá se tedy předpokládat, že hladiny interleukinu – 10 stoupají jako protiváha zánětlivého procesu, který oba typy porodů provází. Na základě této práce badatelé navrhli , že interleukin – 10 může hrát roli v regulaci imunitní odpovědi „in vivo“ zahájením pochodů, které tlumí zánět (Gotsch et al., 2008) . Interleukin – 10 je nejvýznamnějším protizánětlivým cytokinem. Je exprimován především monocyty, Th2 lymfocyty, dále také uvolňován cytotoxickými T-lymfocyty s cílem blokovat pochody navozené NK buňkami (natural killer cells) . Downreguluje expresi cytokinů produkovaných Th1 lymfocyty, HLA antigenů II.třídy, může blokovat aktivitu NF- κ B.

Další práce prokázaly inhibici syntézy prostaglandinů interleukinem – 10 na úrovni placenty u předčasného porodu i inhibici syntézy MMP – 9 v plodových obalech po podání interleukinu – 10 u předčasného porodu , v obou případech „in vitro“ (Fortunato et al., 2001, Hanna et al., 2006) .

Do budoucna tak stále zůstává otevřená otázka možného terapeutického využití v oblasti předčasného porodu. Dalším parametrem, který jsme studovali , byl solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace proteinů – sRAGE. RAGE je multiligandový transmembránový receptor, člen superrodiny imunoglobulinů (Schmidt et al., 1995, Schmidt et al., 2000) . RAGE je exprimován na povrchích četných typů buněk, především na makrofázích, monocitech, endoteliálních buňkách, neuronech, buňkách hladké svaloviny. RAGE je schopen vázat různé ligandy, především produkty pokročilé glykace proteinů, amyloid- β peptid, S100 proteiny, HMGB1 (High Mobility Group Box 1) - tj.mj. produkty poškozených tkání - tzv. DAMPs . (Scaffidi et al., 2002) . Nově je tento typ receptoru řazen mezi pattern recognition receptors - PRR . (viz kapitola 5.3.2) Interakce RAGE s ligandem závisí na buněčném typu a vede k aktivaci intracelulární signální kaskády cestou nukleárního faktoru kappa B (NF – κ B) a následně k expresi genů pro cytokiny a růstové faktory (TNF- α , IL-1, PDGF, IGF-1, interferon γ) , adhezivní molekuly (ICAM-1, VCAM-1), indukci migraci makrofágů, stimulaci buněčné proliferace, up regulaci protrombotické dráhy, zvýšení syntézy kolagenu IV, fibronektinu, proteoglykanů, generaci oxidativního stresu (Schmidt et al., 1995 , Schmidt et al ., 2000) . Solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace proteinů (sRAGE) je zkrácená forma RAGE – jeho extracelulární doména. RAGE and sRAGE hrají roli v patogenezi řady chronických chorob jako jsou např.diabetes mellitus a jeho komplikace, cévní choroby, nádorová onemocnění a zánětlivá onemocnění. sRAGE je považován za nový biomarker řady uvedených chorob (Hudson et al., 2005, Pullerits et al., 2005, Kalousová et al., 2006) . sRAGE má proti RAGE rozdílnou úlohu – může vyvazovat ligandy RAGE z oběhu a snižuje tak

patologické dopady zprostředkované RAGE. Podání sRAGE v experimentu na myších kompletně potlačilo diabetickou aterosklerosu (Park et al., 1998). Místní aplikace sRAGE do standardizovaných diabetických vředů u myši zlepšila jejich hojení (Wear-Maggitti et al., 2004). Podobně byl na myším modelu testován jako léčebná modalita endotoxinem indukovaného poškození plic, kdy po podání sRAGE došlo ke snížení zánětlivé odezvy v tkáních (Zhang et al., 2008). V posledních letech je problematika sRAGE a RAGE v centru zájmu i v oblasti porodnictví. Několik předchozích prací bylo zaměřeno na studium koncentrace sRAGE v plodové vodě. Buhimschi hodnotila koncentrace sRAGE v plodové vodě u žen s předčasným porodem (a především intraamniálním zánětem) a kontrolní skupinou žen v odpovídajících týdnech těhotenství. Mezi hladinami sRAGE u žen s intraamniálním zánětem a kontrolami nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly (Buhimschi et al., 2007). Romero ve své práci zkoumal hladiny sRAGE v plodové vodě v podobně postaveném souboru jako předchozí práce - tj. u předčasných porodů s prokázaným intraamniálním zánětem/infekcí a u kontrol v odpovídajících týdnech těhotenství . Zjistil však zvýšené koncentrace sRAGE v plodové vodě u žen s intraamniálním zánětem či infekcí (Romero, Espinoza , Hassan, et al., 2008). Dosud jen naše výzkumná skupina zkoumala hladiny sRAGE v mateřském séru těhotných a žen s předčasným porodem . V naší předchozí – pilotní - práci jsme prokázali snížení hladin sRAGE u žen s předčasným porodem proti kontrolní skupině těhotných (Hájek et al., 2008) V další studii jsme prokázali, že se hladiny sRAGE v mateřském séru během fyziologického těhotenství mění. Jsou nízké na počátku těhotenství, vrcholu dosahují v 24.-26.týdnu těhotenství a opět klesají ve III.trimestru (Germanová et al., 2009). V jedné ze svých prací se Buhimschi věnovala hodnocení koncentrací sRAGE v krvi předčasně rozených novorozenců s fetální zánětlivou odpovědí (definované elevací pupečnickového interleukinu – 6). Zjistila významné snížení hladin sRAGE v pupečnickové krvi dětí s fetální zánětlivou odpovědí v porovnání s hladinami bez zánětlivé odpovědi (Buhimschi , Baumbusch , Dulay, 2009) . V současném projektu jsme v souladu se závěrem naší první práce (Hájek et al., 2008) prokázali snížení koncentrací sRAGE u předčasného porodu proti kontrolní skupině těhotných v odpovídajících týdnech těhotenství . Příčinou nízkých hladin sRAGE během předčasného porodu na straně matky či u předčasně rozeného novorozence s s fetální zánětlivou odpovědí mohou být infekce, zánět a oxidativní stres. Předpokládáme konzumaci produkty poškození tkání (DAMPs) (Romero , Espinoza , Goncalves et al., 2006,Christiaens et al., 2008, Germanová et al., 2009) .

Druhá část studie se věnovala jen skupině žen s předčasným porodem (Skupina 1). Naším záměrem bylo vyšetřit, jak souvisí studované parametry v mateřské i fetální (pupečnickové) krvi s fetální zánětlivou odpovědí - definovanou jednak elevací interleukinu-6 v pupečnickové krvi získané

po porodu plodu a jednak přítomností funisitis. Předčasný porod , zejména předčasný odtok plodové vody - PPRM, je spojen s výskytem intraamniálního zánětu. Na rozdíl od akutní chorioamnioitidy (zánětu plodových obalů), funisitis (infiltrace pupečníku neutrofily) je dodatečným poporodním histologickým markerem čistě fetální zánětlivé odpovědi – FIRS. Fetální zánětlivá odpověď se přitom může vyskytnout i bez přítomné mateřské zánětlivé odpovědi. Biochemickým kritériem hodnocení fetální zánětlivé odpovědi je elevace interleukinu – 6 v pupečnickové krvi získané před porodem (v experimentu kordocentézou) nebo elevace elevace interleukinu – 6 a CRP v pupečnickové krvi získané po porodu. V prvním případě se jedná o invazivní vyšetření, ve druhém případě o dodatečné hodnocení situace po porodu (Shim et al., 2004) . (viz kapitola 5.4.1.1) Cílem soudobého výzkumu v této oblasti je najít takovou metodu, která by mohla před porodem plodu včas odhalit intraamniální zánět/infekci a především fetální zánětlivou odpověď, pokud možno neinvazivním způsobem. Dosavadní diagnostické postupy to zatím spolehlivě neumožňují. Při případném potvrzení fetální zánětlivé odpovědi bychom mohli lépe vyhodnotit riziko krátkodobé a dlouhodobé dětské morbidity a přizpůsobit tomu management těhotenství a případného předčasného porodu (Romero , Espinoza , Goncalves et al., 2006 , Romero et al. 2007) . Většina prací dosud studovala studovala vztah různých biochemických parametrů k funisitis z plodové vody získané amniocentézou, tedy pomocí invazivního vyšetření. Elevace řady cytokinů (interleukin-6, -8, -1 beta) , MMP-8 v plodové vodě je spojena s funisitis a tedy intraamniálním zánětem (Buhimschi et al. 2006, Romero et al. 2007, Park et al., 2008, Buhimschi , Baumbusch , Dulay, 2009) . Další práce také potvrdily, že je funisitis významně často spojena se současnou elevací hladiny interleukinu – 6 v pupečnickové krvi (Tasci et al., 2006, Buhimschi ,Baumbusch, Dulay et al., 2009) . Ve skupině s funisitis jsme kontextu s výše uvedenými publikovanými daty zjistili významně vyšší hladiny pupečnickového interleukinu-6. Hladiny interleukinu-6 v pupečnickové krvi se mění při fetální zánětlivé odpovědi, nejsou závislé na gestačním stáří (Gomez et al., 1998) . V našem souboru jsme hodnotili vztah studovaných biochemických parametrů ke kritériím fetální zánětlivé odpovědi (tj. histologii a biochemii) nezávisle . Jak ve skupině s funisitis , tak ve skupině s elevací pupečnickového interleukinu-6 (podskupina B) jsme zjistili signifikantně nižší hladiny mateřského MMP-2 proti skupinám bez funisitis a bez fetální zánětlivé odpovědi (podskupina A) . Tyto závěry naznačují možnost využití především mateřského MMP-2 v prenatalní predikci fetálního zánětu pomocí odběru mateřské krve. Poznatky navazují i na zjištění z první části našeho projektu, kde jsme shledali snížení mateřského MMP-2 u žen předčasným porodem proti kontrolnímu souboru těhotných. Podobně jako při hodnocení vztahu MMP-2 a předčasného porodu v první části studie nejsou zatím souvislosti snížení mateřského MMP-2 u fetální zánětlivé odpovědi přesně známy. Porovnávali

jsme také hladiny sRAGE v mateřské a pupečnickové krvi ve skupinách s a bez funisitis a ve skupinách s a bez elevace interleukinu-6. Na rozdíl od jedné z prací, která uvádí snížení hladin sRAGE v pupečnickové krvi u plodů s fetální zánětlivou odpovědí, jsme v naší studii mezi porovnávanými skupinami nezjistili signifikantní rozdíly v koncentracích tohoto parametru (Buhimschi, Baumbusch, Dulay, 2009). Nicméně rozdíly se jak v mateřské tak fetální krvi pohybovaly těsně na hranici významnosti ($p < 0.06$). Rozdílné výsledky mohou být dány relativně malým vzorkem studované populace v naší práci. Jako první jsme též porovnávali hladiny MMP-2,-8,-9 v pupečnickové krvi mezi skupinami s a bez funisitis a mezi skupinami s a bez fetální zánětlivé odpovědi. Nebyly však zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi studovanými skupinami. V tomto případě byl však výsledek spíše očekávaný, uvedené parametry jsme zkoumali především s ohledem na možné změny na straně matky a zařadili jsme je do této části studie z formálních důvodů. Zatímco je možné považovat „přípravu“ předčasného porodu za dlouhodobý proces probíhající skrytě, bez zjevných klinických projevů a elevace markerů zánětu zpravidla nastává až při jeho nevratné fázi, je fetální zánětlivá odpověď akutní povahy (Kim et al., 2001). Proto jsme do této části studie – predikce fetální zánětlivé odpovědi – zařadili i mateřské CRP, které je součástí standardního panelu odběrů u předčasného porodu. Zjistili jsme, že jak v podskupině s elevací interleukinu – 6 (podskupina B), tak v podskupině s funisitis, jsou významně vyšší hladiny CRP. Výsledky jsou v souladu se závěry nedávno provedené multicentrické studie. Sorokin uvádí, že zvýšené koncentrace CRP v mateřském séru u žen s předčasným porodem jsou spojeny s významně vyšším rizikem fetální zánětlivé odpovědi a následným rozvojem odpovídající neonatální morbidity – především krvácením do mozkových komor (IVH) (Sorokin et al., 2010). Závěrem lze shrnout, že naše práce byla první, která prokázala snížené mateřské sérové koncentrace MMP-2 a sRAGE u žen s předčasným porodem v porovnání s hladinami ve fyziologických těhotenstvích v odpovídajících gestačních týdnech. Podobně jsme prokázali významně snížené hladiny MMP-2 v mateřském séru u žen s předčasným porodem a postpartálně zjištěnou fetální zánětlivou odpovědí. Bude však potřeba dalších studií k objasnění funkčního významu těchto nálezů.

10. ZÁVĚR

Spontánní předčasný porod představuje závažný problém, jak z hlediska medicínského, tak z hlediska socioekonomického. Základním patogenetickým projevem spontánního předčasného porodu je zánět. K dispozici jsou nesporné důkazy o zapojení systémů realizující zánětovou odpověď organismu. Stejně či podobné procesy jsou podkladem termínového porodu. Proto hovoříme o tzv. společné dráze předčasného i termínového porodu. Tato společná dráha zahrnuje proces aktivace deciduy a plodových obalů, remodelaci děložního hrdla a změny kontraktility dělohy. Základní rozdíl mezi oběma typy porodů představuje jejich odlišná aktivace. Zatímco u termínového porodu zatím není přesně známo, co tento proces spouští, u předčasného porodu je diskutováno několik příčin, zejména infekce, uteroplacentární ischémie a abnormální působení progesteronu. Pro více možných spouštěcích příčin hovoříme o syndromu předčasného porodu. Zánětlivý pochod se týká jak matky (tj. všech komponent společné dráhy předčasného a termínového porodu), tak plodu. V případě zánětlivé odpovědi plodu lze očekávat vyšší pravděpodobnost dlouhodobých , zejména neurologických a plicních, komplikací u předčasně rozených dětí. Výzkumné projekty v této oblasti jsou proto zaměřeny jak na predikci předčasného porodu, tak na predikci fetální zánětlivé odpovědi. V rámci rutinní diagnostiky jsou u hrozícího či probíhajícího předčasného porodu odebírány standardní biochemické markery zánětu, především CRP. V době jejich významné elevace jsme však spíše svědky vrcholu dosud skrytého procesu předčasného porodu a tento se již většinou nedaří nijak oddálit či zcela zastavit. Většina dosavadních prací uvádí, že se neinvazivním způsobem zánětlivou odpověď plodu nedaří spolehlivě odhalit, na druhou stranu, ani negativní mateřské sérové markery zánětu ji zcela nevylučují. Proto je nadále cílem soudobého výzkumu najít takové parametry, které by mohly odhalit skrytý proces předčasného porodu a zánětlivé odpovědi plodu včas. Do našeho projektu jsme proto vybrali parametry, o nichž lze předpokládat, že se jejich hladiny v rámci zánětlivého procesu mohou měnit relativně dlouhodobě. Cílem naší práce bylo zjistit, jaký je vztah hladin vybraných MMP , sRAGE a il-10 k předčasnému porodu a fetálnímu zánětu. V první části studie jsme porovnávali hladiny uvedených parametrů ve skupině žen s předčasným porodem a v kontrolní skupině těhotných v odpovídajících týdnech těhotenství rodičích nakonec v termínu. Do studie vybrané MMP-2,-8,-9 se podílejí na degradaci extracelulární matrix, především kolagenu, elastinu a fibronektinu. Jsou zapojeny do všech komponent společné dráhy termínového a předčasného porodu, především do procesu aktivace deciduy a plodových obalů. Problematika MMP a předčasného porodu předčastavuje poměrně málo studovanou oblast, výsledky jsou zatím rozporuplné. Příčinou může být mj.odlišná metodika, kdy jsou vzorky získávány z různých tělesných tekutin – plodové vody, séra, moči. V naší práci jsme hodnotili mateřské a pupečnickové sérové MMP. V rámci nulové

hypotézy práce jsme předpokládali, že je elevace všech vybraných MMP spojena s předčasným porodem a fetální zánětlivou odpovědí. Zatímco jsme v případě MMP-9 hypotézu potvrdili, u MMP-8 jsme nezjistili žádné statisticky významné rozdíly. V případě MMP-2 jsme však shledali významně snížené hladiny tohoto parametru ve skupině žen s předčasným porodem proti koncentracím u těhotných kontrol. Tento výsledek dosud neuváděla žádná práce. Vzhledem k velmi malému množství prací v této oblasti je tedy zatím velmi obtížné osvětlit příčiny takového nálezu. Nicméně výsledky některých prací z experimentální oblasti naznačují abnormální regulaci MMP-2 (snížení hladin) během zánětlivého procesu. U interleukinu-10 jsme hypotézu potvrdili. Většina autorů se shoduje, že elevace tohoto protizánětlivého cytokinu hladin provází předčasný porod jako protiváha zánětlivého procesu. V případě sRAGE jsme navázali na výsledky našeho pilotního projektu, kdy jsme prokázali snížení jeho hladin u žen s předčasným porodem proti kontrolní skupině těhotných. Solubilní receptor pro produkty pokročilé glykace proteinů - sRAGE - je v současnosti považován za marker endotelové dysfunkce, která může provázet zánětlivý proces. Jedná se o solubilní formu transmembránového receptoru - RAGE, který je nově je řazen mezi skupinu pattern recognition receptors - PRR. Příčinou nízkých hladin sRAGE během předčasného porodu na straně matky mohou být infekce, zánět a oxidativní stres. Předpokládáme konzumaci produkty poškození tkání. V druhé části studie jsme porovnávali vztah hladin mateřských a pupečnickových MMP -2,-8,-9, mateřského a pupečnickového sRAGE a mateřského interleukinu -10 k fetální zánětlivé odpovědi. Tato byla definována přítomností postpartálně diagnostikované histologické funisitis a elevací interleukinu-6 v pupečnickové krvi získané po porodu plodu z placentární části pupečnicku. Také zde nulová hypotéza předpokládala elevaci všech vybraných MMP u pacientek, kde byla po porodu prokázána fetální zánětlivá odpověď. Podobně jako v první části studie jsme však prokázali významné snížení hladin MMP-2 u fetální zánětlivé odpovědi. Bude však potřeba dalších studií k objasnění funkčního významu snížení hladin MMP-2 u předčasného porodu i fetální zánětlivé odpovědi. S výjimkou mateřského MMP-8 a CRP jsme u ostatních parametrů nezjistili žádné statisticky významné rozdíly. Hladiny mateřského a pupečnickového sRAGE se ve vztahu k fetální zánětlivé odpovědi pohybovaly na hranici statistické významnosti. Jednou z příčin mohl být relativně malý vzorek studované populace, v současnosti přibývají práce, které tento vztah již prokazují. Mezi důležitá zjištění práce patřil nález elevace koncentrací mateřského CRP jak v podskupině s funisitis, tak v podskupině s elevací pupečnickového interleukinu-6. Uvedené je v souladu se závěry zatím jediné - nedávno uzavřené - multicentrické studie, kde autoři navrhuji, že je možné u předčasného porodu využít mateřské CRP k predikci zánětlivé odpovědi plodu.

Dosavadní objevy naznačují, že jsou matrixmetalloproteinázy zapojeny do patofyziologie

předčasného porodu i porodu v termínu. Stejně tak se ukazuje, že i sRAGE/RAGE hrají důležitou roli v zánětlivém procesu předčasného porodu. Ačkoliv experimentální i klinický výzkum v této oblasti přináší stále nové informace, přesná úloha především MMP a sRAGE zůstává z velké části neobjasněna. Pochopení jejich přesné funkce by nám mělo výrazně napomoci v predikci předčasného porodu i fetální zánětlivé odpovědi. Zkoumání zánětlivého pozadí předčasného porodu bude i do budoucna jedním z hlavních cílů naší práce.

11. SUMMARY

Spontaneous preterm labor is a serious problem both in terms of medical and socio-economic aspects. Inflammation is the fundamental pathogenetic manifestation of spontaneous preterm labor. Undisputable evidence is available indicating that systems responsible for inflammatory response of the organism are engaged. The same or similar processes are the foundation of term birth. This common pathway incorporates processes of activation of the decidua and fetal membranes, cervical remodelling, and changes in uterine contractility. An essential difference between both types of births consists in their different activation. While the triggering process of term birth is not known exactly, several causes have been discussed for preterm labor, in particular infection, uteroplacental ischemia and abnormal progesterone activity. The preterm labor syndrome has been used to reflect the multitude of potential triggering events. The inflammatory process affects both the mother (i.e. all components of the common pathway of preterm and term labor) and the fetus. A fetal inflammatory response means that a higher probability of long-term, particularly neurological and pulmonary complications can be expected in the prematurely born infants. Research projects in this field have therefore focused both on prediction of preterm labor and on prediction of fetal inflammatory response. Standard biochemical inflammatory markers, especially CRP, are collected as part of routine diagnostics in a threatening or already occurring preterm birth. However, their significantly elevated values rather tell that what is being witnessed is the peak of the preterm birth process hidden until then, and an effort of its postponement or stoppage usually remains unsuccessful. A fetal inflammatory response cannot be revealed in a non-invasive manner either, neither is it excluded by negative serum inflammatory markers in the mother. Therefore the present research focuses on finding those parameters that might reveal a hidden process of preterm labor and fetal inflammatory response in time. We have therefore chosen those parameters for our project whose levels in the inflammatory process can be assumed to be changing in a relatively long-term manner. The aim of our work was to determine the relationship between the levels of selected MMPs, sRAGE and il-10 on one side, and preterm birth and fetal inflammation on the other. The first part of the study compares levels of the parameters above in a group of women with preterm birth and in a control group of pregnant women at corresponding weeks of pregnancy who eventually delivered their children at full term. MMP-2, -8, -9 selected for the study take part in degradation of extracellular matrix, particularly of collagen, elastin and fibronectin. They are engaged in all components of the common pathway of term and preterm labor, especially in the process of activating the decidua and fetal membranes. The field of MMPs and preterm labor has been studied relatively little and the results remain inconsistent until now. This may be caused by

different methods where the samples are obtained from various physical liquids – amniotic fluid, serum, urine. In our work, we evaluated mother and umbilical serum MMPs. Our null hypothesis assumed that the elevation of all selected MMPs was associated with preterm labor and fetal inflammatory response. While confirmed for MMP-9, no statistically significant differences were found for MMP-8. However, significantly reduced levels of this parameter were found for MMP-2 in the group of women with preterm labor compared to the respective concentrations in pregnant controls. This difference has not been mentioned in any paper. Due to the very small amount of papers dealing with this subject, it thus still remains very difficult to shed any light on the causes of such a finding. However, the results of some experimental papers indicate abnormal regulation of MMP-2 (reduced levels) during an inflammatory process. The hypothesis was confirmed for interleukin-10. Most authors agree that elevated levels of this anti-inflammatory cytokine accompanies preterm labor as a counterbalance of the inflammatory process. As regards sRAGE, we continued from the results of our pilot project where its reduced levels had been shown for women with preterm labor compared to the control group of pregnant women. The soluble receptor for advanced glycation end-products – sRAGE – of proteins is currently viewed as a marker of endothelial dysfunction, which may accompany an inflammatory process. It is a soluble form of the transmembrane receptor – RAGE, newly classified as one of pattern recognition receptors – PRR. The causes of low sRAGE levels during preterm birth on part of the mother may include an infection, inflammation and oxidation process. Its consumption by tissue damage products has been assumed. The second part of our study compares how mother and umbilical MMP -2, -8, -9 levels, mother and umbilical sRAGE, and mother interleukin-10 are related to fetal inflammatory response. The response was defined by presence of postpartal diagnosed histological funisitis and elevation of interleukin-6 in umbilical blood obtained from the placental part of the umbilical cord after the delivery. In this respect, the null hypothesis also assumed elevation of all selected MMP in those patients where fetal inflammatory response was shown after the birth. However, similarly as in the first part of our study, significant reduction of MMP-2 levels was shown in the fetal inflammatory response. Nevertheless, further studies are needed to clarify the functional meaning of reduced MMP-2 levels in preterm birth and fetal inflammatory response. With the exception of mother MMP-8 and CRP, no statistically significant differences were found for the other parameters. Mother and umbilical sRAGE levels ranged near the borderline of statistical significance in respect of fetal inflammatory response. The relatively small sample of the study population may have been one of the causes; the number of papers where evidence of this relationship is provided, published since our project, has been rising. Important findings of our work included the finding of elevated mother CRP concentrations both in the subgroup with funisitis as well as in the subgroup with

elevated umbilical interleukin-6. This is in line with the conclusions of a single for now – recently closed – multicentric study where its authors suggest that mother CRP may be used in preterm birth to predict inflammatory response of the fetus.

Recent discoveries suggest that matrix metalloproteinases are engaged in the pathophysiology of preterm labor as well as in the process of term parturition. Similarly, sRAGE / RAGE have been shown to play an important role in the inflammatory process of preterm birth. Although new information keeps emerging based on experimental and clinical research in the field, the exact role particularly of MMP and sRAGE still remains largely unexplained. Understanding their exact function should be considerably helpful in predicting preterm labor as well as fetal inflammatory response. Investigating the inflammatory background of preterm labor shall remain one of the major aims of our work also in the future.

12. LITERATURA

- Albertsen K, Andersen A MN, Olsen J, et al. Alcohol consumption during pregnancy and the risk of preterm delivery. *Am J Epidemiol* 2004. 159:155-161
- Alge-Priglinger CS, Kreutzer T, Obholzer K, Wolf A, Mempel M, Kernt M.; Kampik A, Priglinger SG. Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2009. 50: 5495-5503
- American College of Obstetricians and Gynecologists: Perinatal Risks Associated with Assisted Reproductive Technology. Committee Opinion No.324. *Obstet Gynecol* 2005. 106:1143-1146
- Ananth CV, Vintzileos AM. Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006. 19:773-782
- Ancel PY, Lelong N, Papiernik E, EUROPOP , et al: History of induced abortion as a risk factor for preterm birth in European countries: Results of the EUROPOP survey. *Hum Reprod* 2004. 19:734-740
- Andersen HF, Nugent CE, Wanty SD, et al. Prediction of risk for preterm delivery by ultrasonographic measurement of cervical length. *Am J Obstet Gynecol* 1990. 163:859-867
- Andrews WW, Hauth JC, Goldenberr RL, et al. Amniotic fluid interleukin – 6 : correlation with upper genital tract microbial colonization and gestation age in women delivered after spontaneous labor versus indicated delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1995. 173:606 – 612
- Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, et al. Interleukins – 1, - 4 , - 6 , - 10 , tumor necrosis factor, transforming growth factor beta, FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphism in Australian women: Risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004. 191:2056
- Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Baarholm OA, Van-Assche T, Cunnington C, Pillai R, Ratnatunga C, Tousoulis D, Stefanadis C, Refsum H, Channon KM. MTHFR 677CT polymorphism reveals functional importance for 5-methyltetrahydrofolate, not homocysteine, in regulation of vascular redox state and endothelial function in human atherosclerosis. *Circulation* 2009. 119:2507-15
- Arias F, Rodriquez L, Rayne SC, et al. Maternal placental vasculopathy and infection : Two distinct subgroups among patients with preterm labor and preterm premature ruptured membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993. 168:585-591
- Arias F, Romero R, Joist H et al. Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. *J Matern Fetal Neonatal Med* 1998. 7: 277 – 286

- Asrat T. Intra-amniotic infection in patients with preterm prelabor rupture of membranes. Pathophysiology, detection, and management. *Clinics In Perinatology* 2001. 28:736 – 739
- Balducci J, Risek B, Gilula NB et al. Gap junction formation in human myometrium: A key to preterm labor? *Am J Obstet Gynecol* 1993. 168: 1609 – 1615
- Balkovetz DF. Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006. 290: 572 – 579
- Behrman RE, Stith Butler . 2007. Institute of Medicine Committee on Understanding Preterm Birth and Assuring Healthy Outcomes. Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention. 2007. Washington, DC: National Academies Press. 792s.
- Bell SC, Meade EA. 2004. *Fetal membrane rupture*. In: Critchley H, Bennett P, Thornton S, ed. Preterm Birth. 2004.London: RCOG Press. s.195-212
- Biggio JR, Ramsey PS, Cliver SP et al. Midtrimester amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) levels above the 90th percentile are a marker for subsequent preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2005. 192:109 – 113
- Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M.et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 2007. 13: 1450 – 1457
- Bloomfield FH, Oliver MH, Hawkins P, et al. Periconceptional undernutrition in sheep accelerates maturation of the fetal hypothalamic – pituitary – adrenal axis in late gestation. *Endocrinology* 2004. 145:4278-4285
- Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinase function. *Biochem Soc Symp* 2003. 70:1-14
- Buhimschi CS, Baumbusch MA, Dulay AT et al. Characterization of RAGE, HMGB1, and S100beta in inflammation-induced preterm birth and fetal tissue injury. *Am J Pathol* 2009. 175: 958-975
- Buhimschi CS, Dulay AT, Abdel-Razeq S, Zhao G, Lee S, Hodgson EJ, Bhandari V, Buhimschi IA. Fetal inflammatory response in women with proteomic biomarkers characteristic of intra-amniotic inflammation and preterm birth.*BJOG* 2009. 116: 57-67
- Buhimschi CS., Buhimschi IA., Abdel-razeq. Proteomic analysis of the amniotic fluid (AF) predicts funisistis and early – onset neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 2006. 195: suppl. 1. S 170
- Buhimschi IA, Zhao G, Pettker CHM. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) system in women with intraamniotic infection and inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 2007. 196: 181.e1 – 181.e12

- Bukowski R, Malone FD, Porter FT et al. Preconceptional folate supplementation and the risk of spontaneous preterm birth: a cohort study. *PloS Med* 2009. 6: e1000061
- Bytautiene E , Romero R, Vedernikov YP. Induction of premature labor and delivery by allergic reaction and prevention by histamin H1 receptor antagonist. *Am J Obstet Gynecol* 2004. 191: 1356 – 1361
- Carbone JF, Rampersad R. Prenatal screening for thrombophilias: indications and controversies. *Clin Lab Med* 2010. 30: 747 – 760
- Casey ML, Cox SM, Beutler B, et al. TNF alfa in human decidua: potential role of cytokines in infection induced preterm labor. *J Clin Invest* 1989. 83:430-436
- Cnattingius S. The epidemiology of smoking during pregnancy: Smoking prevalence, maternal characteristics and pregnancy outcome. *Nicotine Tob Res* 2004. 6(suppl 2):S125-S140
- Coleman MA, France JT, Schellenberg JC, et al. Corticotropin – releasing hormone, corticotropin – releasing hormone-binding protein, and activin A in maternal serum : Prediction of preterm delivery and response to glucocorticoids in women with symptoms of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2000. 183:643-648
- Cook JL, Zaragoza DB, Sung DH , et al. Expression of myometrial activation and stimulation genes in mouse model of preterm labor: Myometrial activation, stimulation , and preterm labor. *Endocrinology* 2000. 141:1718 – 1728
- Csapo AI, Pulkkinen M. Indispensability of the human corpus luteum in the maintenance of early pregnancy. Luteectomy evidence. *Obstet Gynecol Surv* 1978. 33:69-81
- Da Fonseca EB, Bittar RE, Carvalho MH, Zugaib M. Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: a randomized placebo-controlled double-blind study. *Am J Obstet Gynecol* 2003.188: 419 – 23
- Da Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaidis KH. Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. *N Engl J Med* 2007. 357:462 – 469
- Darby MJ, Caritis SN, Shen-Schwarz S. Placental abruption in the preterm gestation : An association with chorioamnionitis. *Obstet Gynecol* 1989. 74:88-92
- Daskalakis GJ, Papantoniou NE, Koutsodimas NB. Fetal fibronectin as a predictor of preterm birth. *J Obstet Gynaecol* 2000. 20:347-353
- Dawood MY, Wang CF, Gupta R, Fuchs F. Fetal contribution to oxytocin in human labor. *Obstet Gynecol* 1978. 52:205-209
- Defranco EA, O'brien JM, Adair CD. Vaginal progesterone is associated with a decrease in risk for early preterm birth and improved neonatal outcome in women with a short cervix: a

- secondary analysis from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007. 30: 697 – 705
- Donders GG, Desmyter J, De Wet DH, et al. The association of gonorrhoea and syphilis with premature birth and low birth weight. *Genitourin Med* 1993. 69:98-101
- Engel SA, Erichsen HC, Savitz DA , et al. Risk of spontaneous preterm birth is associated with common proinflammatory cytokine polymorphisms. *Epidemiology* 2005. 16: 469 – 477
- Flint APF, Anderson ABM, Steele PA, et al. The mechanism by which fetal cortisol controls the onset of parturition in the sheep. *Bioch Soc Trans* 1975. 3:1189 – 1194
- Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997. 177:731–741,
- Fuchs AR, Husslein P, Fuchs F. Oxytocin and the initiation of human parturition : Stimulation of prostaglandin production in human decidua by oxytocin. *Am J Obstet Gynecol* 1981. 141:694-697
- Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, et al. Oxytocin receptors and human parturition: A dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science* 1982. 215:1396-1398
- Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS:. Oxytocin receptors in the human uterus during pregnancy and parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1984. 150:734-741
- Garfield RE, Bytautiene E, Vedernikov YP , Marsal JS, Romero R. Modulation of rat uterine contractility by mast cells and their mediators. *Am J Obstet Gynecol* 2000. 183:118 – 125
- Germanová A, Koucký M, Hájek Z, Pařízek A, Zima T, Kalousová M. Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy. *Clin Biochem* 2009. 42: 442 – 446
- Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med* 2010. 48: 1121 – 1132
- Goland RS, Wardlaw SL, Stark RI, et al. High levels of corticotropin releasing hormone immunoreactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1986. 63:1199-1203
- Goldenberg RL, Culhane JF, Johnson DC. Maternal infection and adverse fetal and neonatal outcome. *Clin Perinatol* 2005. 32:523-559
- Goldenberg RL, Iams JD, Miodovnik M, et al. The Preterm Prediction Study: Risk factors in twin gestations. *Am J Obstet Gynecol* 1996. 175:1047-1053
- Goldman S, Weiss A, Shalev E. The effect of progesterone on gelatinase expression in the decidua and fetal membranes before and after contractions. *Am J Obstet Gynecol* 2007.197:521 e1-

- Gomez R, Romero R, Edwin SS. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature of membranes associated with intra-amniotic infection. *Infect Dis Clin North.Am* 1997. 11:135 – 142,
- Gomez R, Romero R, Ghezzi F, The fetal inflammatory response syndrome (FIRS). *Am J Obstet Gynecol* 1998. 179:194-202
- Gotsch F, Romero R., Kusanovic JP. et al. The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic infection/inflammation, and spontaneous parturition at term: a role for interleukin-10. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008. 21: 529 – 47
- Graham D, Clarke CL. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocrine Reviews* 1997. 18:502-519
- Guillard C, Zidi I, Marcou Cet al. Role of HLA-G in innate immunity through direct activation of NF-kappaB in natural killer cells. *Mol Immunol* 2008 45: 419 – 427
- Hack M, Flannery DJ, Schluchter M, et al. Outcomes in young adulthood for very low birth weight infants. *N Engl J Med* 2002. 346:149-157
- Haddad R, Tromp G, Kuivaniemi H, et al. Spontaneous labor at term is characterized by a genomic signature of acute inflammation in chorioamniotic membranes but not in the systemic circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2006. 195:394.e1-24
- Hájek Z, Germanová A, Koucký M et al. Detection of feto-maternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study. *J Perinat Med* 2008, 36:399–404
- Haluska GJ, Wells TR, Hirst JJ, et al. Progesterone receptor localization and isoforms in myometrium , decidua, and fetal membranes from rhesus macaques: Evidence for functional progesterone withdrawal at parturition. *J Soc Gynecol Investig* 2002. 9:125-136
- Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ. Births: Preliminary data for 2005. Health E-Stats. *Natl Vital Stat Rep* 2005. 54:1-17
- Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, Reddy P, Murphy S, Romero R, et al. Evidence of interleukin-10-mediated inhibition of cyclooxygenase expression and prostaglandin production in preterm human placenta. *Am. J. Reprod. Immunol* 2006. 55: 19-27
- Harger JH, Hsing AW, Tuomala RE, et al. Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: A multicenter case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1990. 163:130-137
- Hassan SS, Romero R, Haddad R, et al. The transcriptome of the uterine cervix before and after spontaneous term parturition. *Am J Obstet Gynecol* 2006. 195:778 - 786
- Heath V, Southall T, Souka A, et al. Cervical length at 23 weeks of gestation : Prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998. 12:312-317

- Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, et al. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: A systematic review of controlled studies. *BMJ* 2004. 328:261
- Hendler I, Goldenberg RL, Mercer BM, et al: Preterm Prediction Study: Association between maternal body mass index (BMI) and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2005. 192:882-886
- Holt R, Timmons BC, Akgul Y et al. The molecular mechanisms of cervical ripening differ between term and preterm birt. *Endocrinology* 2011. 152:1036-1046
- Hsu HW, Figueroa JP, Honnebier MB , et al. Power spectrum analysis of myometrial electromyogram and intrauterine pressure changes in pregnant rhesus monkey in late gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 161:567 – 473
- Hudson BI, Harja E, Moser B, Schmidt AM. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and coronary artery disease. The next C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005. 25:879–82
- Hudson BI, Schmidt AM. RAGE: a novel target for drug intervention in diabetic vascular disease. *Pharm Res* 2004. 21:1079–86.
- Chaiworapongsa T, Espinoza J, Yoshimatsu J, et al. Activation of coagulation system in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002. 11:368-373
- Challis JRG. Regulation of the hypothalamo – pituitary – adrenocortical axis in fetal sheep. *Trends Endocrinol Metab* 1996. 7:239-246
- Challis JRG, Gibb W. Control of parturition. *Prenat Neonatal Med* 1996. 1:283-291
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ: Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* 2000. 21:514-550
- Chan EC, Fraser S, Yin S , et al. Human myometrial genes are differentially expressed in labor: A suppression subtractive hybridization study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007. 87:2435 – 2441
- Choi SJ , Jung KL , Oh SY, Roh CR. Cervicovaginal matrix metalloproteinase-9 and cervical ripening in human term parturition. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 2009. 142:43–47
- Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchel BF, Olson DM. Inflammatory process in preterm and term parturition. *Journal of Reproductive Immunology* 2008. 79:50-57
- Iams JD, Casal D, McGregor JA, et al. Fetal fibronectin improves the accuracy of diagnosis of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1995. 173:141-145
- Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, et al. The length of the cervix and the risk of sponatenous

- premature delivery. *N Engl J Med* 1996. 334:567-573
- Jakobsson M, Gissler M, Sainio S, et al. Preterm delivery after surgical treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 2007. 109:309-313
- Janeway C, Traves P, Schlomchik M. 2005. *Innate immunity*. In: Immunobiology. 2005. New York: Garland Science. s.37 – 102
- Jones SA, Challis JR. Effects of corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin on prostaglandin output by human placenta and fetal membranes. *Gynecol Obstet Invest* 1990. 29:165-168.
- Kalousová M, Hoďková M, Kazderová M, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis* 2006. 47: 406–11
- Kayem H, Maillard F, Schmitz et al. Prediction of clinical infection in women with preterm labour with intact membranes: a score based on ultrasonographic, clinical and biological markers. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009.145:36-40
- Keirse MJ. Progestogen administration in pregnancy may prevent preterm delivery. *BJOG* 1990. 97:149 – 54
- Kiecolt-Glaser JK, McGuire L, Robles TF, et al. Psychoneuroimmunology: Psychological influences on immune function and health. *J Consult Clin Psychology* 2002. 70:537-547
- Kim CJ, Yoon BH, Kim M, Park JO, Cho SY, Chi JG. Histo-topographic distribution of acute inflammation of the human umbilical cord. *Pathol Int* 2001. 51:861-5
- Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. TLR-2 a TLR-4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnioitis. *Am J Obstet Gynecol* 2004. 19:1346-1355
- Kim KW, Romero R, Park HS, et al. A rapid matrix metalloproteinase – 8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature of membranes . *Am J Obstet Gynecol* 2007. 197:292.e1-5
- King BR, Smith R, Nicholson RC. The regulation of human corticotropin – releasing hormone gene expression in the placenta. . *Peptides* 2001. 22:1941-1947
- Kiviat NB, Wolner-Hanssen P, Eschenbach DA et al. Endometrial histopathology in patients with culture-proved upper genital tract infection and laparoscopically diagnosed acute salpingitis. *Am J Surg Pathol* 1990, 14:167 – 165
- Knox Jr IC, Hoerner JK The role of infection in premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1950. 59:190-194
- Kovats S, Main E, Librach C: HLA-G expressed in human trophoblast. *Science* 1990. 248:220-223
- Kramer MS, Kahn SR, Platt RW et al. Mid-trimester maternal plasma cytokines and CRP as

- predictors of spontaneous preterm birth. *Cytokine* 2009. . 49:10-14
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008. 1778:631 – 645
- Krikun G, Lockwood CJ, Abrahams VM, et al. Expression of toll-like receptors in the human decidua. *Histol Histopathol* 2007. 22:847-854
- Kwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 2008. 93:153 – 161
- Kyrklund-Blomberg NB, Cnattingius S. Preterm birth and maternal smoking: Risks related to gestational age and onset of delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1998. 179:1051
- Lee J, Romero R, Xu Y, Kim JS, Topping V, Yoo W, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Hassan SS, Yoon BH, Kim CJ. A signature of maternal anti-fetal rejection in spontaneous preterm birth: chronic chorioamnionitis, anti-human leukocyte antigen antibodies, and C4d. *PLoS One* 2011. 6, e16806.
- Lefebvre DL, Piersanti M, Bai XH , et al. Myometrial transcriptional regulation of gap junction gene, Connexin-43. *Reproductive Fertil Dev* 1995. 7:603 – 611
- Leviton A. Preterm birth and cerebral palsy: is TNF-alfa the missing link ? *Dev Med Child Neurol* 1993. 35:553-558
- Ley, K. 2001. *History of inflammation research*. In Lee K.,ed.Physiology of Inflammation. New York:Oxford University Press. 2001. s.1-10
- Li J , Fan R , Zhao S , Zhang W et al. Reactive Oxygen Species Released from Hypoxic Hepatocytes Regulates MMP-2 Expression in Hepatic Stellate Cells. *Int J Mol Sci* 2011. 12:. 2434-2447
- Li W, Challis JR: Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005. 90:6569-6574
- Liggins G. 1981. *Cervical ripening as an inflammatory reaction*. In Ellwood D, Anderson A : The Cervix in Pregnancy and Labor: Clinical and Biochemical Investigations. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1981 .s.103 – 122
- Liggins GC, Thorburn GD. 1994. *Initiation of parturition*. In Lamming GE: Marshall's Physiology of Reproduction. London. Chapman and Hall. 1994. 1362s.
- Lin PJ: Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Womens Health* 2004.13:33-39.
- Lockwood SA, Challis JR Effects of corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotropin on

- prostaglandin output by human placenta and fetal membranes. *Gynecol Obstet Invest* 1990. 29:165-168
- Lockwood CJ, Krikun G, Hausknecht VA, et al. Matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase inhibitor expression in endometrial stromal cells during progestin-initiated decidualization and menstruation-related progestin withdrawal. *Endocrinology* 1998. 139:4607-4613
- Lockwood CJ, Radunovic N, Nastic D, et al Corticotropin-releasing hormone and related pituitary-adrenal axis hormones in fetal and maternal blood during the second half of pregnancy. *J Perinat Med* 1996. 24:243-251
- Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, et al. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery? *N Engl J Med* 1991. 325:669-674
- Lockwood CJ, Stocco C, Murk W, et al. Human labor is associated with reduced decidual cell expression of progesterone, but not glucocorticoid, receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2010. 95:2271-2275
- Lockwood CJ, Toti P, Arcuri F, et al. Mechanisms of abruption – induced premature rupture of the fetal membranes: thrombin – enhanced interleukin-8 expression in term decidua. *Am J Pathol* 2005. 167:1443-1449
- Lockwood CJ. Stress-associated preterm delivery: The role of corticotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1999. 180:S264-S266
- Lye SJ, Tsui P, Dorogin A, et al. *Myometrial programming : A new concept underlying the maintenance of pregnancy and the initiation of labor*. In VIIIth International Conference on the Extracellular Matrix of the Female Reproductive Tract and Simpson Symposia, Center for Reproductive Biology, University of Edinburgh, 2004
- Madden JD, Gant NF, MacDonald PC. Study of the kinetics of conversion of maternal plasma dehydroisoandrosterone sulfate to 16-alfa hydroxydehydroisoandrosterone sulfate, estradiol and estriol. *Am J Obstet Gynecol* 1978. 132:392-395
- Madsen G, Zakar T, Ku CY, et al. Prostaglandins differentially modulate progesterone receptor-A and -B expression in human myometrial cells: Evidence for prostaglandin-induced functional progesterone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 2004. 89:1010-1013
- Makrakis E, Grigoriou O, Kouskouni E. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in plasma/serum and urine of women during term and threatened preterm labor: a clinical approach. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003. 14:170 – 176
- Mastorakos G, Ilias I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci* 2003. 997:136-149

- Matthews SG, Challis JRG. Regulation of the hypothalamo – pituitary – adrenocortical axis in fetal sheep. *Trends Endocrinol Metab* 1996. 7:239-246
- Maymon E, Romero R, Gomez R, Berry SM et al. A role for the 72 kDA gelatinase (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in human parturition, premature rupture of membranes and intraamniotic infection. *J Perinat Med* 2001. 29:308 – 316
- Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, Yoon BH. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000. 183 :887 – 894
- McDonald HM, Brocklehurst P, Gordon A. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2007. CD000262
- McIntire DD, Leveno KJ. Neonatal mortality and morbidity rates in late preterm births compared with births at term. *Obstet Gynecol* 2008. 111:35-41
- McKeown KJ, Challis JRG. Regulation of expression of 15 – hydroxyprostaglandin dehydrogenase by corticotropin-releasing hormone through a calcium-dependent pathway in human chorion trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003. 88:1737-1741
- McLean M, Bisits M, Davies J et al. A placental clock controlling the length of human pregnancy *Nature Medicine* 1995 . 1:460 - 463
- Meis P, Goldenberg R, Mercer B, et al. The Preterm Prediction Study: Risk factors for indicated preterm births. *Am J Obstet Gynecol* 1998. 178:562-567
- Meis P, Michielutte R, Peters T, et al. Factors associated with preterm birth in Cardiff, Wales. *Am J Obstet Gynecol* 1995. 173:597-602
- Meis PJ, Klebanoff M, Thom E. Prevention of recurrent preterm delivery by 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate. *N Engl J Med* 2003.348:2379 – 85,
- Mendelson CR, Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Mol Endocrinol* 2009. 23:947 – 954
- Mercer BM, Goldenberg RL, Moawad A, et al. The Preterm Prediction Study: Effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1999. 181:1216-1221
- Mesiano S. Myometrial progesterone responsiveness and the control of human parturition. *J Soc Gynecol Investig* 2004. 11:193-202
- Miller YI, Choi SH, Witztum JL et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res* 2011. 108:235 – 248

- Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002. 2:656-663
- Mor G. Pregnancy reconceived. *Natural History* 2007 116:36-41
- Moreau C, Kaminski M, Ancel PY, EPIPAGE Group , et al. Previous induced abortions and the risk of very preterm delivery: Results of the EPIPAGE study. *BJOG* 2005. 112:430-437
- Nathanielsz P, Honnebier M. 1992. *Myometrial function*. In Drife J, Calder A: Prostaglandins and the Uterus. 1992 .London. Springer-Verlag..161-176
- Nathanielsz P, Poore E, Brodide A.et al.1987. *Update of molecular events of myometrial acitivity during pregnancy*. In Nathanielsz P, Parer J: Research in Perinatal Medicine. 1987. Ithaca. NY: Perinatology. s.111
- Neggers Y, Goldenberg RL.Some thoughts on body mass index , micronutrient intakes and pregnancy outcome. *J Nutr* 2003. 133:1737S-1740S
- Neilson JP. Mifepristone for induction of labor. *Cochrane Database Syst Rev* 2000.CD002865
- Newman RB, Iams JD, Das A, et al.A prospective masked observational study of uterine contraction frequency in twins.*Am J Obstet Gynecol* 2006. 195:1564-1570
- Ni X, Hou Y, Yang R, et al.Progesterone receptors A and B differentially modulate corticotropin-releasing hormone gene expression through a cAMP regulatory element. *Cell Mol Life Sci* 2004. 61:1114-1122
- Nøhr B, Tabor A, Frederiksen K, et al. Loop electrosurgical excision of the cervix and the subsequent risk of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007. 86:596-603
- Norwitz ER, Robinson JN, Challis JRG. The control of labor. *N Engl J Med* 1999. 341:660-667
- Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosis bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991. 29:297-301
- O'Brien M, Morrison JJ, Smith TJ,et al. Upregulation of PSCDBP, TLR2,TWIST1, FLJ35382, EDNRB and RGS12 gene expression in human myometrium at labor .*Reprod Sci* 2008. 15:382-393
- Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, et al.Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol* 2006. 107:29-36
- Oh SY, Kim CJ, Park I, et al. Progesterone receptor isoform (A/B) ratio of human fetal membranes increases during term parturition. *Am J Obstet Gynecol* 2005. 193:1156-1160
- Okun N, Gronau KA, Hannah ME. Antibiotics for bacterial vaginosis or Trichomonas vaginalis in pregnancy. A systematic review. *Obstet Gynecol* 2005.105:857-868
- Olson DM. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003. 17:717-730
- Ombelet W, Martens G, De Sutter P, et al.Perinatal outcome of 12 021 singleton and 3108 twin

- births after non-IVF assisted reproduction: A cohort study. *Hum Reprod* 2006. 21:1025-1032
- Oshiro B, Edwin S, Silver R. Human fibronectin and human tenascin production in human amnion cells. *J Soc Gynecol Invest* 1996. 3:351A.
- Ota A, Yonemoto H, Someya A, Itoh S, Kinoshita K, Nagaoka I. Changes in matrix metalloproteinase 2 activities in amniochorions during premature rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* 2006. 13:592-7.
- Park CW, Lee SM, Park JS, Jun JK et al. The antenatal identification of funisitis with rapid MMP – 8 bedside test. *J Perinat Med* 2008. 36:497 – 502
- Park L, Roman KG, Kee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 1998., 4:1025–31
- Patel FA, Clifton VL, Chwalisz K, Challis JR. Steroid regulation of prostaglandin dehydrogenase activity and expression in human term placenta and chorio-decidua in relation to labor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999. 84:291-299
- Patni S, Flynn P, Wynen LP, Thornton CA. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labor. *BJOG* 2007. 114:1326-34
- Peyron R, Aubeny E, Targosz V, et al. Early termination of pregnancy with mifepristone (RU 486) and the orally active prostaglandin misoprostol. *N Engl J Med* 1993.328:1509-1513
- Pieber D, Allport VC, Hills F, et al. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labor. *Mol Hum Reprod* 2001. 7:875-879
- Pitřha J, Roztočil K, Cíková R et al. Endoteliální dysfunkce a její hodnocení *Cor Vasa* 2001.43: 452-456
- Poon LC, Nekrasova E, Anastassopoulos P, Livanos P, Nicolaides KH. First trimester maternal serum MMP-9 and adverse pregnancy outcome. *Pren Diagn* 2009. 29:553-559
- Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg R, Tarkowski A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther* 2005. 7:817–24
- Rahkonen L, Rutanen EM, Nuutila M. Elevated levels of decidual insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical fluid in early and mid-pregnancy are associated with an increased risk of spontaneous preterm delivery. *BJOG* 2010. 117:701 – 710
- Rajabi M, Solomon S, Poole AR. Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig. *Endocrinology* 1991.128:863-871
- Rawlings ND, Barrett AJ: Evolutionary families of metalloproteinases. *Meth Enzymol* 1995 248:183-228

- Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science* 1999. 284:1308 – 1310
- Ritchie DM, Hahn DW, McGuire JL. Smooth muscle contraction as a model to study the mediator role of endogenous lipoxygenase products of arachidonic acid. *Life Sci* 1984. 34:509-513
- Romero R, Espinoza J, Erez O: The role of cervical cerclage in obstetric practice: can the patient who could benefit from this procedure be identified? *Am J Obstet Gynecol* 2008. 194:1 – 9
- Romero R, Avila C, Sepulveda W et al. 1993. *The role of systemic and intrauterine infection in preterm labor*. In Fuchs A, Fuchs F, Stubblefield P. *Preterm Birth : Causes, Prevention, and Management*. 1993. NY: McGraw-Hill, s.97 - 136
- Romero R, Durum SK, Dinarello CA, et al.: Interleukin-1: *A signal for the initiation of labor in chorioamnionitis*. 33rd Annual Meeting for the Society for Gynecologic Investigation, Toronto, Ontario, 1986
- Romero R, Espinoza J, Goncalves LF et al. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med* 2007 25:21 – 39
- Romero R, Espinoza J, Gotsch F, et al. The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006. 113:118-135
- Romero R, Espinoza J, Hassan S, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and endogenous secretory RAGE (esRAGE) in amniotic fluid: modulation by infection and inflammation. *J Perinat Med* 2008. 36:388–398
- Romero R, Espinoza J, Mazor M, et al. 2004. *The preterm parturition syndrome* . In: Critchely H, Bennett P, Thornton S. *Preterm Birth*. 2004. London: RCOG Press. 2004. s.28-60
- Romero R, Gomez R, Ghezzi F, et al. A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1998. 179:186-193
- Romero R, Kuivaniemi H, Tromp G. Functional genomics and proteomics in term and preterm parturition. *J Clin Endocrinol Metab* 2002. 87:2431 – 2434
- Romero R, Lockwood Ch. 2009. *Overview of the Mechanisms of Labor*. In Creasy RK, Resnik E. Iams et al: *Maternal – Fetal Medicine. Principles and Practice*, 6th edition. 2009. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Romero R, Mazor M, Manogue K, et al. Human decidua : A source of cachectin-tumor necrosis factor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991. 41:123-127
- Romero R, Mazor M, Munoz H, et al. The preterm labor syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1994. 734:414-429
- Romero R, Mazor M, Wu YK, et al. Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin*

Perinatol 1988. 12:262-279

- Romero R, Mazor M. Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 1988.31:553 – 560
- Romero R, Munoz H, Gomez R, et al. Increase in prostaglandin bioavailability precedes the onset of human parturition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996.54:187-191
- Romero R, Oyarzun E, Mazor M, et al. Meta-analysis of the relationship between asymptomatic bacteriuria and preterm delivery/low birth weight. *Obstet Gynecol* 1989. 73:576-582
- Romero R, Wu YK, Brody DT, et al. Human decidua : A source of interleukin-1. *Obstet Gynecol* 1989. 73:31-34
- Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Nien NK. Inflammation in preterm and term labor and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006. 11:317-26
- Romero R, Chaiworapongsa T, Kuivaniemi H. Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk of preterm birth: a role for genetic epidemiology in the prevention of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004.190:1509 – 1519
- Roth J, Vogl T, Sorg C, et al. Phagocyte-specific S100 proteins: A novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* 2003. 24:155 – 158
- Ruiz RJR, Fullerton JC, Dudley DJM. The interrelationship of maternal stress, endocrine factors and inflammation on gestational length. *Obstet Gynecol Surv* 2003. 58:415-428
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002. 418: 191–5
- Sciscione A. for the NICHD MFMU Network : Perinatal outcomes in women with twin gestations who conceived spontaneously versus by assisted reproductive techniques (ART). Society for Maternal-Fetal Medicine: 2008 28th Annual Meeting, abstract 260. *Am J Obstet Gynecol* 2007. 196:S84.
- Shields AD, Wright J, Paonessa DJ, et al. Progesterone modulation of inflammatory cytokine production in fetoplacental artery explant model. *Am J Obstet Gynecol* 2005. 193:1144-1148
- Shim SS, Romero R, Hong JS, Park CW, Jun JK, Kim BI, Yoon BH. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2004. 191:1339-1345
- Shynlova O, Dorogin A, Lye S. Monocyte chemoattractant protein-1 integrates mechanical and endocrine signals that mediate term and preterm labor. Abstract 539, Society for Gynecologic Investigation. Reno.NV. 2007
- Schumacher A, Wafula PO, Bertoja AZ, et al. Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007. 110:1137 – 45

- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995;96:1395-403
- Schmidt AM, Yanc SD, Yana SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligand. *BBA – Mol Cell Res* 2000. 1498:99–111
- Schmidt C, Orr H. Maternal/Fetal interactions: The roles of the MHC class I molecule HLA-G. *Crit Rev Immunol* 1994. 13:207-224
- Silva JA, Lorencini M, Peroni LA, De La Hoz CL, Carvalho HF, Stach-Machado DR. The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodontal Res* 2008. 43:48-54
- Smith LK, Draper ES, Manktelow BN, et al. Socioeconomic inequalities in very preterm birth rates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Educ* 2007. 92:F11-F14
- Sorokin Y, Romero R, Mele L, Wapner RJ, Iams JD, Dudley DJ, Spong CY, Peaceman AM, Leveno KJ, Harper M, Caritis SN, Miodovnik M, Mercer BM, Thorp JM, O'Sullivan MJ, Ramin SM, Carpenter MW, Rouse DJ, Sibai B. Maternal serum interleukin-6, CRP, and MMP-9 concentrations as risk factor for preterm birth < 32weeks and adverse neonatal outcomes. *Am J Perinatol* 2010;27: 631 – 640
- Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003 8:29-38
- Stjernholm-Vladic Y, Wang H, Stygar D, et al. Differential regulation of the progesterone receptor A and B in the human uterine cervix at parturition. *Gynecol Endocrinol* 2004. 18:41-46
- Sunagawa S, Takagi K, Ono K. Comparison of biochemical markers and cervical length for predicting preterm delivery. *J Obstet Gynaecol Res* 2008. 34:812-819
- Szekers – Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002. 21:471 – 495
- Šimák J. 2000. *Záněť jako obranný a autoagresivní fenomén*. In *Obecná patologická fyziologie*. Nečas E.a spolupracovníci. 2000. Praha: Nakladatelství Karolinum. s.129 – 149
- Taipale P, Hiilesmaa V. Sonographic measurement of uterine cervix at 18 – 22 weeks' gestation and the risk of preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1998;92:902-907
- Tanir HM, Sener T, Yildiz Z. Cervical phosphorylated insulin-like growth factor binding protein-1 for the prediction of preterm delivery in symptomatic cases with intact membranes. *J Obstet Gynecol Res* 2009. 35:66 - 72
- Tasci Y, Dilbaz B, Uzmez Onal B, Caliskan E, Dilbaz S, Doganci L, Han U. The value of cord

- blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funisitis and neonatal infection in term premature rupture of membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006. 128:34-39
- Terrone DA, Rinehart BK, Granger JP, et al. Interleukin-10 administration and bacterial endotoxin-induced preterm birth in a rat model. *Obstet Gynecol* 2001. 98:476-480
- Than NG, Romero R, Erez O. Emergence of hormonal and redox regulation of galectin-1 in placenta mammals: implication in maternal-fetal immune tolerance. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2008. 105:15819 – 15824,
- Thaxton JE, Nevers TA, Sharma S. TLR-mediated preterm birth in response to pathogenic agents. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010, Epub 2010, article id. 378472
- Thompson JM, Irgens LM, Rasmussen S, Daltveit AK. Secular trends in socio-economic status and the implications for preterm birth. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006. 20:182-187
- Thrakill CL, Clemmons DR, Handwerger S. Differential regulation of IGFBP-1 secretion from human decidual cells by IGF-1, relaxin and insulin. *J Clin Invest* 1990. 86:878
- Timmons BC, Mitchell SM, Gilpin C, Mahendroo MS. Dynamic changes in the cervical epithelial tight junction complex and differentiation occur during cervical ripening and parturition. *Endocrinology* 2007.148:1278 – 1287
- Toricelli M, Voltolini C, Conti N, De Bonis M, Biliotti G, Picciolini E, Petraglia F. Inflammatory and infectious risk factors are associated with the response to tocolysis in patients with preterm labor. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011. 24:43-46
- Trinchieri G. Interleukin – 10 production by effector T cells show self control. *J Exp Med* 2007. 204:239-243
- Van der Burg B, Van der Saarg PT. Nuclear factor kappa B/steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs. *Mol Hum Reprod* 1996. 2:433 – 438
- Van Meir CA, Matthews SG, Keirse MJ, et al. 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase: Implications in preterm labor with and without ascending infection. *J Clin Endocrinol Metab* 1997. 82:969-976
- Vohr BR, Wright LL, Dusick AM, et al. Center differences and outcomes of extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2004.113:781-789
- Watari M, Watari H, DiSanto ME et al. Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrix-metabolizing enzymes in human cervical smooth muscle cells. *American Journal of Pathology* 1999. 154:1755–1762
- Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, et al. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996. 97:210-215

- Wear-Maggitti K, Lee J, Conejero A, Schmidt AM, Grant R, Breitbart A. Use of topical sRAGE in diabetic wounds increases neovascularization and granulation tissue formation. *Ann Plast Surg* 2004. 52:519–21
- Wegmann TG, Guilbert LJ. Immune signaling at the maternal-fetal interface and trophoblast differentiation. *Dev Comp Immunol* 1992. 16:425-430
- Wei SQ, Fraser W, Luo ZC. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2010 . 116:393-401
- Weiss A, Goldman S, Shalev E. The matrix metalloproteinases (MMPs) in the decidua and fetal membranes. *Front Biosci* 2007. 12: 649-659
- Williams MA, Mittendorf R, Lieberman E, et al. Adverse infant outcomes associated with first-trimester vaginal bleeding. *Obstet Gynecol* 1991. 78:14-18
- Winkvist A, Mogren I, Hogberg U . Familiar patterns in birth characteristics: Impact on individual and population risks. *Int J Epidemiol* 1998. 27:248 – 254
- Wood NS, Marlow N, Costeloe K, et al. Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. *N Engl J Med* 2000. 343:378-384
- Xu H, Gonzalez JM, Ofori E, Elovitz M. Preventing cervical ripening: the primary mechanism by which progestational agents prevent preterm birth? *Am J Obstet Gynecol* 2008.198:314.e1-314.e8,
- Xu P, Alfaidy N, Challis JRG . Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Human Placenta and Fetal Membranes in Relation to Preterm and Term Labor. *Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism* 2002. 87:1353 – 1361
- Yang J, Hartmann KE, Savitz DA, et al. Vaginal bleeding during pregnancy and preterm birth. *Am J Epidemiol* 2004;160:118-125
- Yoon BH, Jun JK, Romero R, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines , neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 1997. 177:19-26
- Yoon BH, Romero R, Kim CJ, et al. High expression of TNF-Alpha and interleukin-6 in periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol* 1997. 177:406-411
- Yoon BH, Romero R, Lim JH et al. The clinical significance of detection of Ureaplasma urealyticum in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction . *Am J Obstet Gynecol* 2003. 189:919 – 924
- Yoon BH, Romero R, Moon JB et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001. 185:1130 – 1136
- Yoon BH, Romero R, Shim JY, et al. Atypical chronic lung disease of the newborn is linked to fetal

systemic inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 2002. 187:S129

Yoshida M, Sagawa N, Itoh H, et al Prostaglandin F (2alfa) , cytokines and cyclic mechanical stretch augment matrix metalloproteinase-1 secretion from cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 2002. 8:681-687

Youssef RE, Ledingham MA, Norman JE. The role of TLR- 2 and – 4 and triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM – 1) in human term and preterm labor. *Reprod Sci* 2009. 16:843 – 856

Zeeman GG, Khan-Dawood FS, Dawood MY. Oxytocin and its receptor in pregnancy and parturition: Current concepts and clinical implications. *Obstet Gynecol* 1997. 89:873-883

Zhang H, Tasaka S, Shiraishi Y, et al. Role of soluble receptor for advanced glycation end products on endotoxin-induced lung injury. *Am J Respir Care Med* 2008. 178:256–62

13. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Původní práce publikované v impaktovaných časopisech:

Práce, které jsou podkladem dizertace:

Koucký M, Germanová A, Kalousová M, Hill M, Cindrová-Davies T, Pařízek A, Svarcová J, Zima T, Hájek Z.

Low maternal serum matrix metalloproteinase (MMP)-2 concentrations are associated with preterm labor and fetal inflammatory response.

J Perinat Med 2010. 38:589-96 (IF = 1,736), dosud necitováno

Germanová A, Koucký M, Hájek Z, Pařízek A, Zima T, Kalousová M.

Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy.

Clin Biochem 2010. 43:442-6 (IF = 2,019), dosud citováno 1x dle ISI Web of Knowledge

Hájek Z, Germanová A, Koucký M, Zima T, Kopecký P, Vítkova M, Pařízek A, Kalousová M.

Detection of fetomaternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study.

J Perinat Med 2008. 36:399-40 (IF = 1,234), dosud citováno 8x dle ISI Web of Knowledge

Celkový počet citací autora : 9

Další původní práce v impaktovaných časopisech:

Kunstyr J, Lips M, Belohlavek J, Prskavec T, Mlejnsky F, Koucky M, Sebron V, Balik M

Spontaneous delivery during veno-venous extracorporeal membrane oxygenation in swine influenza-related acute respiratory failure. Letter to Editor.

Acta Anaesthesiol Scand 2010. 54:1154-5 (IF = 2,26)

Hill M, Pařízek A, Jirásek JE, Jirkovská M, Velíková M, Dusková M, Klímková M, Pasková A, Zizka Z, Germanová A, Koucký M, Kalousová M, Stárka L.

Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids?

Physiol Res 2010. 59:211-24 (IF = 1,430)

Germanová A, Jáchymová M, Germanová A, Koucký M, Hájek Z, Zima T, Kalousová M.,
Pregnancy-Associated Plasma Protein A Polymorphisms in Patients with Risk Pregnancies

Folia Biologica 2011. 57: 82-85 (IF = 0,547)

Přehledové články:

Koucký M, Binder T, Krejčí V, Živný J. Porodnické aspekty peripartální kardiomyopatie.

Česká Gynekol 2003. 68:111-4

Koucký M, Hájek Z, Pařízek A. Diagnóza a management infekce a její role u předčasného porodu. .

Česká Gynekol 2006. 71:6-13

Koucký M, Germanová A, Hájek Z, Pařízek A, Kalousová M, Kopecký. P. Novinky v patofyziologii předčasného porodu.

Česká Gynekol 2009. 74:54-63

Koucký M, Germanová A, Hájek Z, Pařízek A, Kalousová M, Kopecký P. Pathophysiology of preterm labor. *Prague Med Rep* 2009. 110:13-24

Koucký M, Germanová A, Hájek Z, Pařízek A, Kalousová M, Kopecký P. Prenatal and perinatal management of preterm labour. *Prague Med Rep* 2009. 110:269-7

Abstrakta:

Hájek Z, Germanová A, Koucký M, Kobilková J, et al.

New markers in detection of inflammation in PPRM.

8th World Congress of Perinatal Medicine, SEP 09-13, 2007 Florence, ITALY

PROCEEDINGS OF THE 8TH WORLD CONGRESS OF PERINATAL MEDICINE Pages: 475-479

Spilka J, Chudáček V, Koucký M, et al. Assessment of non-linear features for intrapartum fetal heart rate classification. 9th International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine, NOV 04-07, 2009 Larnaka, CYPRUS, 2009 9TH INTERNATIONAL CONFERENCE

ON INFORMATION TECHNOLOGY AND APPLICATIONS IN BIOMEDICINE Pages: 389-392

Chudáček V, Huptych M, Koucký M, et al. Fetal heart rate data pre-processing and annotation. 9th International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine, NOV 04-07,2009,Larnaka,CYPRUS, 2009 9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON INFORMATION TECHNOLOGY AND APPLICATIONS IN BIOMEDICINE Pages: 385-388

Chudáček V, Spilka J, Huptych M, Koucký M. et al Automatic Classification of Intrapartal Fetal Heart-Rate Recordings - Can It Compete with Experts? Conference Information: 1st International Conference on Information Technology in Bio- and Medical Informatics, SEP 01-02, 2010 Bilbao, SPAIN INFORMATION TECHNOLOGY IN BIO- AND MEDICAL INFORMATICS Book Series: Lecture Notes in Computer Science. Volume: 6266. Pages: 57-66

14. PŘÍLOHY

14.1 Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 26. 5 2011

MUDr. Michal Koucký

14.2 Identifikační záznam s abstrakty a klíčovými slovy

KOUCKÝ , Michal. *Vztah koncentrace vybraných markerů zánětu a endotelové dysfunkce k předčasnému porodu a fetálnímu zánětu. [The relationship between selected inflammation markers and markers of the endothelial dysfunction to preterm labor and fetal inflammatory response]*. Praha, 2011. 117 s. 3 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1.lékařská fakulta, Gynekologicko-porodnická klinika. Vedoucí práce Hájek, Zdeněk.

Abstrakt:

Dizertační práce je zaměřena na úlohu zánětu v patogenezi předčasného porodu. V první části práce jsme se popsali současný náhled na patofyziologii předčasného porodu. V druhé části jsme se zabývali hodnocením vztahu vybraných markerů zánětu a endotelové dysfunkce k předčasnému porodu a fetální zánětlivé odpovědi. Nejvýznamnějšími zjištěními naší práce bylo snížení hladin matrixmetaloproteinázy-2 (MMP-2) a snížení hladin sRAGE ve skupině žen s předčasným porodem proti kontrolní skupině těhotných. Podobně jsme prokázali snížení hladin MMP-2 u žen s následně diagnostikovanou fetální zánětlivou odpovědí. sRAGE je současnosti řazen mezi pattern recognition receptors. V případě sRAGE jsme navázali na výsledky našeho pilotního projektu, kdy lze předpokládat, že za jeho nízkými hladiny stojí konzumpce produkty poškození tkání. Potvrdili jsme tak, že hraje důležitou roli v patogenezi předčasného porodu. U MMP-2 předpokládáme abnormální regulační mechanismy tvorby tohoto enzymu. V obou případech bude však potřeba dalších prací k osvětlení funkčního významu našich výsledků.

Abstract:

The doctoral dissertation is focused on the role of inflammation in the pathogenesis of preterm labor. In the first part, we describe the current view on pathophysiology of preterm labor. In the second part, we evaluated the relationship of specific markers of inflammation and endothelial dysfunction to preterm birth and fetal inflammatory response. The most important findings of our study was that we found decreased levels of MMP-2 and decreased levels of sRAGE in women with preterm labor in comparison with the control group of pregnant women. Similarly, we found decreased levels of MMP-2 in women with subsequent diagnosed fetal inflammatory response. sRAGE is currently ranked among pattern recognition receptors. In the case of sRAGE we followed the results of our pilot project, it can be assumed that the its low level are connected with tissue damage. We confirmed that it can play an important role in the pathogenesis of preterm

labor. We assume abnormal regulatory mechanisms of the production of MMP-2. In both cases, however, further studies are required to elucidate the functional significance of our results.

Klíčová slova:

Předčasný porod – Fetální zánětlivá odpověď – Zánět – Endoteliální dysfunkce – Matrixmetalloproteinázy – sRAGE

Premature labor – Fetal inflammatory response - Inflammation – Endothelial dysfunction – sRAGE

14.3 Kopie vlastních publikací v odborných časopisech

Low maternal serum matrix metalloproteinase (MMP)-2 concentrations are associated with preterm labor and fetal inflammatory response.

Detection of feto-maternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study.

Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy.

Original articles – Obstetrics

Low maternal serum matrix metalloproteinase (MMP)-2 concentrations are associated with preterm labor and fetal inflammatory response*

Michal Koucký¹, Anna Germanová^{1,2}, Marta Kalousová², Martin Hill³, Tereza Cindrová-Davies⁴, Antonín Pařízek¹, Jana Švarcová², Tomáš Zima² and Zdeněk Hájek^{1,**}

¹ Department of Gynecology and Obstetrics of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

² Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

³ Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

⁴ Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, Cambridge, UK

Abstract

Objectives: To assess the relationship between maternal and umbilical serum concentrations of matrix metalloproteinases (MMP)-2,8,9, the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and IL-10 and premature delivery and fetal inflammation.

Methods: Maternal serum levels of MMPs, sRAGE, IL-10 and C-reactive protein (CRP) were determined in 67 women with preterm labor and in 38 healthy pregnant women of similar gestational age (GA). In the group with preterm labor we also determined umbilical concentrations of MMPs, IL-6 and sRAGE. The group with preterm labor was additionally divided based on the presence of funisitis and elevations of fetal umbilical IL-6 concentrations.

Results: Maternal serum levels of MMP-2 and sRAGE were significantly lower in women with preterm labor compared to women with normal pregnancy. Additionally, within the group of women with preterm labor, maternal serum MMP-2 concentrations were significantly lower in the subgroup with funisitis and in the subgroup with elevated umbilical concentration of IL-6.

Conclusion: Our results demonstrate significantly different serum concentrations of MMP-2 and sRAGE in women with

preterm labor compared to healthy pregnant patients of the same GA.

Keywords: IL-6; IL-10; matrix metalloproteinases; preterm labor; soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE).

Introduction

The particular pathogenetic process of premature labor is inflammation. This process affects both mother and fetus. The fetal inflammatory response syndrome (FIRS) can occur without maternal response and is characterized by laboratory, histological and clinical criteria [27, 29]. Fetuses with inflammatory response have higher perinatal morbidity, particularly due to severe (stage III or IV) intraventricular hemorrhage (IVH), periventricular leukomalacia, necrotizing enterocolitis, bronchopulmonary dysplasia, myocardial dysfunction and neonatal sepsis with a more frequent incidence of premature delivery, compared to fetuses without inflammatory response. Elevated interleukin-6 (IL-6) concentrations in umbilical blood are associated with a significant increase in the incidence of funisitis (umbilical inflammation). At present, basic criteria for diagnosing FIRS include increased cytokine levels (particularly IL-6), elevated levels of immature forms of neutrophilic granulocytes, elevated C-reactive protein (CRP) in umbilical blood sampled after delivery, histological (funisitis, chorionamnionitis) and clinical correlates. A systemic inflammatory fetal response, as measured by elevated fetal plasma IL-6 levels, is an independent risk factor for the occurrence of severe neonatal morbidity [8]. Pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α) play an important role in term and preterm delivery, irrespective of the presence of infection. They facilitate increased synthesis of matrix metalloproteinases (MMPs) in the decidua, fetal membranes and amniotic fluid (AF) [4]. In addition to being important intermediaries in the pathological processes leading to preterm labor, MMPs also play a crucial role in activation of labor at term [33]. MMPs represent an interesting family of zinc-dependent enzymes that belong to the class of metalloproteases [25]. MMPs are commonly classified on the basis of their substrate specificity and cellular localization into following collagenases, gelatinases, stromelysins, and membrane type MMPs (MT-MMPs). Two gelatinases, MMP-2 and MMP-9, have been implicated in the mechanisms of membrane rupture, and collagenase MMP-8 has been implicated in the mechanism of intraamniotic inflammation [26]. IL-10 counterbalances cytokines that promote labor. It is believed to be a key cyto-

*The study was supported by research project given by the Grant Agency of Charles University, No. 71408.

**Corresponding author:

Zdeněk Hájek, MD, DSc

Department of Gynecology and Obstetrics of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital
Charles University in Prague

Apolinářská 18

128 00 Prague 2

Czech Republic

E-mail: prof.zdenek.hajek@seznam.cz

kine for the maintenance of pregnancy [13]. IL-10 has also been implicated in the control of preterm parturition associated with inflammation [12].

The receptor for advanced glycation end products, RAGE, is a multi-ligand receptor which belongs to the immunoglobulin superfamily [30]. The RAGE-ligand interaction depends on the cell type and leads to activation of the nuclear factor κ B (NF- κ B) intracellular signalling pathway and consequent expression of genes for cytokines and growth factors (TNF- α , IL-1, PDGF, IGF-1, interferon γ), adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1), induction of macrophage migration, stimulation of cell proliferation, up-regulation of prothrombotic pathways, increased synthesis of collagen IV, fibronectin and proteoglycans and generation of oxidative stress [30]. Soluble receptor for advanced glycation end products, (sRAGE), is a truncated form of the RAGE extracellular domain. RAGE and sRAGE play an important role in the pathogenesis of several chronic diseases, such as diabetes mellitus, cancer, vascular and inflammatory diseases [14, 15, 24]. Several authors have also reported the importance of sRAGE in pregnancy. Buhimschi et al. [3] measured sRAGE concentrations in AF and found that sRAGE levels in AF are probably influenced by gestational age (GA) of fetus and probably unaffected by intra-amniotic infection. On the contrary, Romero et al. [28] discovered elevated sRAGE concentration in AF with infection. This study follows our previous findings of reduced levels of sRAGE in women with preterm labor [6, 11]. sRAGE might act as a decoy by binding RAGE ligands. In diabetic mice, sRAGE administration completely suppressed diabetic atherosclerosis [23] and topical application of sRAGE to standardized diabetic wounds improved healing of wounds in diabetic mice [32]. sRAGE was also tested as a treatment modality in endotoxin-induced lung injury [34].

The aim of this study was to assess the relationship between maternal and umbilical serum concentrations of MMP-2,8,9, sRAGE and IL-10, premature delivery and fetal inflammation.

Materials and methods

The study was conducted at the Department of Gynecology and Obstetrics of the General University Hospital in Prague. The study population included 105 women who were divided into two groups. Group 1 consisted of 67 women examined at the time of preterm labor. These patients either presented with contractions and intact membranes or with contractions and ruptured membranes (<12 h before the onset of labor). Group 1 patients gave birth between 25 and 36 weeks. Control Group 2 consisted of 38 healthy pregnant women of similar GA who were examined in various weeks of pregnancy and followed up during routine prenatal care. These women were between 24 and 36 weeks of pregnancy and delivered at term. Blood samples were taken from the cubital vein either at the time of preterm labor (Group 1) or as part of a routine prenatal examination (Group 2). The following parameters were analyzed in both groups: total MMP-2,8,9, IL-10, CRP and sRAGE. In Group 1, we also measured the concentrations of IL-6, total MMP-2,8,9 and sRAGE in post partum umbilical vein blood samples and we performed histological analyses of umbilical cords and placenta.

All blood samples were centrifuged at 1450 g for 10 min, and serum samples were stored at -80°C and analyzed within 6 months.

The FIRS was diagnosed on the basis of elevated umbilical IL-6 levels or the presence of funisitis. Group 1 ($n=67$) was therefore subdivided into subgroups A and B based on the elevated levels of umbilical IL-6 and was also subdivided into subgroups with or without funisitis. Both criteria of fetal inflammatory response were compared independently and we did not compare differences between subgroups with/without funisitis and subgroups A and B (see below). IL-6 levels were analyzed by the ROC curve and concentrations >23 pg/mL were defined as pathognomonic for FIRS. Subgroup A (fetal IL-6 ≤ 23 pg/mL) consisted of 34 patients and subgroup B (fetal IL-6 >23 pg/mL) consisted of 24 patients. Nine samples from the umbilical vein did not contain a sufficient amount of blood and were thus excluded. Additionally, the presence of funisitis (the histological counterpart of FIRS) was used as another criterion to subdivide Group 1 patients (Table 1). Funisitis was diagnosed by the presence of neutrophil infiltration into the umbilical vessel walls or Wharton's jelly. GA was calculated according to the date of the last menstrual period and confirmed by the first trimester ultrasound scan. Exclusion criteria for the study were urinary or other local or systemic infection, previous antibiotic therapy (in the past 3 weeks), multiple gestation, immuno-compromising conditions and diabetes. Patients with clinical chorioamnionitis (i.e., at least one incident of body temperature exceeding 38°C , combined with at least two of the following symptoms: maternal or fetal tachycardia, uterine tenderness, foul-smelling vaginal discharge, white blood cell count $>18 \times 10^9$, increased CRP levels) were enrolled for the study. The study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethical Committee. All patients were well-informed verbally and in writing about the purpose and procedure of the investigation and gave their informed consent prior to entering the study.

MMPs, IL-6, IL-10 and sRAGE were measured by ELISA. Standard kits were used according to the manufacturers' protocol (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA). Concentrations of MMPs were expressed in ng/mL and those of IL-6, IL-10 and sRAGE in pg/mL. CRP was measured turbidimetrically.

Because of a non-Gaussian distribution of most measured variables, the differences between medians (Groups 1 and 2) were evaluated using Mann-Whitney test. When GA significantly differed between two groups, we applied an analysis of covariance (ANCOVA) with GA as a covariate (instead of the Mann-Whitney test). The statistical software Statgraphics Centurion (version XV, Statpoint Inc., Herndon, VA, USA) was used for data transformations and for ANCOVA, and the Mann-Whitney test was conducted using NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA). The relationship between two sets of variables was evaluated using multivariate regression with reduction of dimensionality (the method of bidirectional orthogonal projections to latent structures,

Table 1 Study population and division to subgroups.

Study population	$n=105$
Group 1 – women with preterm labor	$n=67$
Group 2 – women with physiological pregnancy	$n=38$
Group 1 – women with preterm labor	$n=67$
Subgroup with funisitis	$n=25$
Subgroup without funisitis	$n=42$
Group 1 – women with preterm labor	$n=67$
Subgroup A: umbilical serum interleukin-6 ≤ 23	$n=34$
Subgroup B: umbilical serum interleukin-6 >23	$n=24$
Excluded samples	

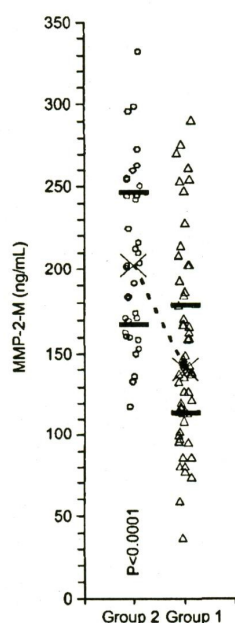


Figure 1 Analysis of maternal serum MMP-2 (MMP-2-M) concentrations (ng/mL) in women with premature delivery (Group 1) and in healthy pregnant controls (Group 2).

O2PLS). Results were considered as statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Preterm labor patients had significantly lower MMP-2 levels compared to the control group of healthy women (141 ± 57 ng/mL vs. 203 ± 52 ng/mL, $P < 0.0001$; Figure 1). We also found significantly lower serum sRAGE levels and significantly increased MMP-9 and IL-10 levels in patients with preterm labor compared to the control group of healthy wom-

en. MMP-8 concentrations were not different. Median GA was 29 weeks in both groups (Table 2).

We analyzed the relationship between the concentrations of CRP and the individual parameters measured in maternal serum. MMP-2 and sRAGE correlated negatively with CRP concentrations whereas MMP-8, MMP-9 and maternal IL-10 concentrations correlated positively with CRP levels. GA correlated negatively with the levels of CRP (Table 3).

We compared the levels of measured parameters in the two subgroups of women with preterm labor, depending on the presence or absence of funisitis. To exclude the effects of GA on the concentrations of MMPs, IL-10, IL-6 and sRAGE, patients with and without funisitis were matched for GA (ANCOVA; Table 4). The levels of maternal MMP-2 were significantly lower in the group of women with funisitis (124 ± 50 ng/mL vs. 159 ± 57 ng/mL, $P < 0.002$). Additionally, maternal levels of IL-6 and CRP were significantly higher in the preterm group with funisitis. Other parameters showed no differences.

We compared the correlation of monitored parameters with the presence of funisitis in the group of patients with preterm labor. Maternal and umbilical serum levels of MMP-2 both correlated negatively with the presence of funisitis whereas maternal serum MMP-8 and -9 concentrations and umbilical MMP-8 concentrations correlated positively with the presence of funisitis. Umbilical serum sRAGE levels correlated negatively with the presence of funisitis (Table 5).

Using the ROC, we determined the fetal IL-6 concentration of 23 pg/mL or higher to be pathognomonic for fetal inflammatory response (subgroups A and B). Concentrations of individual parameters were compared in both subgroups (Table 6). Medians of GAs were different in the two preterm labor subgroups. To exclude the effect of GA on the concentrations of CRP, maternal and umbilical MMPs, maternal IL-10 and maternal and umbilical sRAGE, the patients in both subgroups were matched for GA. As compared to subgroup A, maternal serum MMP-2 concentrations were significantly lower in subgroup B (117 ± 37 ng/mL, vs. 164 ± 61 ng/mL, $P < 0.05$; Figure 2). In contrast, maternal serum MMP-8 and CRP concentrations were significantly

Table 2 Values of CRP, gestational age, sRAGE-M, birth weight, IL-10-M, MMP-2-M, MMP-8-M, MMP-9-M, for women with preterm labor and physiological pregnancy.

Variables	Preterm labor – Group 1		Physiological pregnancy – Group 2		Significance
	n	Median	n	Median	
CRP	67	11.50 (5.00–32.3)	38	2.00 (2.00–4.75)	$P < 0.0001$
Gestational age	67	29 (26–32)	38	29 (26–32)	NS
sRAGE-M	67	581 (381–822)	38	735 (540–962)	$P < 0.04$
Birth weight	67	1300 (940–1905)	38	3220 (2930–3700)	$P < 0.0001$
IL-10-M	67	6.90 (3.30–14.20)	38	3.99 (1.27–6.18)	$P < 0.003$
MMP-2-M	67	141 (114–179)	38	203 (167–246)	$P < 0.0001$
MMP-8-M	67	53 (28–103)	38	49.70 (31.10–67.00)	NS
MMP-9-M	67	1521 (948–1912)	38	1113 (764–1379)	$P < 0.008$

Results are presented as median (interquartile range). The difference between groups are evaluated by Mann-Whitney test.

CRP = C-reactive protein, sRAGE-M = maternal serum sRAGE (pg/mL), IL-10-M = maternal serum interleukin-10 (pg/mL), MMP-2,-8,-9-M = maternal serum concentrations of MMPs (ng/mL), birth weight in gramms.

Table 3 Dependence of CRP, on gestational age, maternal serum MMPs, IL-10, and sRAGE as evaluated using multivariate regression (orthogonal projection to latent structures).

Variables		Correlation with common predictive component	Significance of the parameters	Parameter/95% CI
CRP	Dependent variable	0.650	P<0.01	3.51
Gestational age		-0.304	P<0.01	-1.99
MMP-2-M		-0.723	P<0.01	-5.43
MMP-8-M	Predictors	0.196	P<0.05	1.01
MMP-9-M		0.333	P<0.05	1.52
IL-10-M		0.569	P<0.01	3.60
sRAGE-M		-0.252	P<0.05	-1.35
R ²			46.3%	

R² is the percent of variation of dependent variable explained by the model.

CRP=C-reactive protein, MMP-2,-8,-9-M=maternal serum concentrations of MMPs, IL-10-M=maternal serum interleukin-10, sRAGE-M=maternal serum sRAGE.

higher in subgroup B. We found no significant differences between any other biochemical parameters studied.

Discussion

Recent understanding of the pathophysiological mechanisms of preterm labor led to the discovery of new diagnostic and therapeutic procedures. The factors assumed to play a role in the pathogenesis of premature delivery include infection, uteroplacental ischemia, disorders of hormone metabolism, impaired maternal tolerance to the fetus, allergy, uterine overdistention and cervical incompetence [29]. Numerous publications provide evidence to link the above-mentioned mechanisms to the inflammatory process of premature delivery [1, 2, 4, 8, 26, 27]. The pathogenesis of the so-called preterm parturition syndrome might therefore include several causes with possible mutual combinations [26].

Changes in the levels of various biochemical markers in maternal serum, AF and urine have been studied extensively in order to identify the risk factors of preterm labor and fetal inflammatory response. In our study, we chose parameters that were likely to change during an inflammatory process, such as MMPs, IL-10 and sRAGE. In the first part of the study, we compared maternal serum concentrations of MMPs, IL-10 and sRAGE in women with preterm labor to controls of women who delivered at term. We found significantly lower levels of MMP-2 and significantly higher levels of MMP-9 in women with preterm labor. MMP-2 and MMP-9 are gelatinases, which contribute to the degradation of amniotic and chorionic extracellular matrix and thus play a key role in the process of preterm delivery. During labor, MMP-9 is the major MMP responsible for the gelatinolytic activity in the membranes whilst MMP-2 is the dominant MMP in the decidua [33]. The functions of MMP-2 and MMP-9 are quite different. MMP-2 is constitutively expressed where-

Table 4 Values of CRP, gestational age, sRAGE-M, sRAGE-U, IL-6-U, birth weight, IL-10-M, MMP-2-M, MMP-8-M, MMP-9-M, MMP-2-U, MMP-8-U, MMP-9-U for women with and without funisitis adjusted with gestational age (GA).

Variables	Without funisitis		With funisitis		Significance (gestational age-adjusted ANCOVA)
	n	Median	n	Median	
CRP	42	8.00 (3.00–21.00)	25	26.00 (8.00–59.00)	GA: P<0.006
Gestational age	42	30.00 (27.30–32.80)	25	28.00 (26.00–30.00)	P<0.02*
sRAGE-M	42	580 (391–901)	25	583 (377–818)	GA: NS
sRAGE-U	42	2679 (2064–4395)	25	1545 (814–3339)	GA: NS
IL-6-U	42	7 (4.00–27.00)	25	210.30 (11.80–300.00)	GA: P<0.002
Birth weight	42	1423 (983–2038)	25	1000 (930–1620)	GA: P<0.0001
IL-10-M	42	5.30 (3.30–10.70)	25	8.31 (3.99–44.45)	GA: NS
MMP-2-M	42	159 (122–204)	25	124 (100–146)	GA: P<0.002
MMP-8-M	42	46.00 (22.00–71.00)	25	82.50 (32.20–124.90)	GA: P<0.05
MMP-9-M	42	1286 (815–1866)	25	1598 (1328–1989)	GA: NS
MMP-2-U	42	371.00 (329.00–431.00)	25	316.50 (248.90–356.80)	GA: NS
MMP-8-U	42	3.30 (1.80–6.20)	25	13.50 (5.70–41.90)	GA: NS
MMP-9-U	42	127.00 (83.00–198.00)	25	145.00 (61.50–310.50)	GA: NS

*Mann-Whitney test. Results are presented as median (interquartile range).

CRP=C-reactive protein, sRAGE-M=maternal serum sRAGE (pg/mL), sRAGE-U=umbilical serum sRAGE (pg/mL), IL-6-U=umbilical serum interleukin-6 (pg/mL), IL-10-M=maternal serum interleukin-10 (pg/mL), MMP-2,-8,-9-M=maternal serum MMPs (ng/mL), MMP-2,-8,-9-U=umbilical serum MMPs (ng/mL).

Table 5 Dependence of MMPs and sRAGE in maternal and fetal blood on funisitis as evaluated using multivariate regression (orthogonal projection to latent structures); the sRAGE in the maternal blood and MMP-9 in the umbilical blood did not significantly correlate with predictive components and therefore it was excluded from the final OPLS model.

Variables		Correlation with common predictive component	Significance of the parameters	Parameter/95% CI
Funisitis	Dependent variable	0.591	P < 0.01	3.13
MMP-2-M		-0.616	P < 0.01	-2.30
MMP-8-M		0.617	P < 0.01	2.66
MMP-9-M	Predictors	0.550	P < 0.01	0.129
sRAGE-U		-0.553	P < 0.01	-2.33
MMP-2-U		-0.818	P < 0.01	-7.50
MMP-8-U		0.677	P < 0.01	4.42
R ²				34.9%

R² is the percent of variation of dependent variable explained by the model.

MMP-2,-8,-9-M = maternal serum concentrations of MMPs, MMP-2,-8-U = umbilical concentrations of MMPs, sRAGE-U = umbilical serum sRAGE.

as MMP-9 is an inducible enzyme. It is thus surprising to find reduced MMP-2 levels in the maternal serum of women with preterm labor. This is the first study to report lower MMP-2 concentrations in the maternal serum of preterm labor patients although similar results have been reported [18, 20]. Maymon et al. [20] found significantly lower MMP-2 concentrations in AF of women with premature rupture of membranes and in patients with microbial invasion of the amniotic cavity with preterm premature rupture of membranes, compared to control patients who underwent amniocentesis at a similar GA and later delivered at term. Additionally, we found significantly higher maternal serum concentrations of MMP-9 in women with preterm labor compared to healthy controls. Similar findings were also reported by Makrakis et al. [19] and Maymon et al. [20].

Uterine quiescence is maintained hormonally by placenta-secreted progesterone and by CRH. A fall in the levels of progesterone is an important trigger of parturition [10, 21]. The effect of gestagens on the expression of MMP has been studied experimentally. Goldman et al. [7] studied the effect of exogenous progesterone on the expression of MMP-2 in the decidua and in fetal membranes. The investigators discovered that the MMP-2 expression was inhibited by progesterone administration but only in the decidua and only before the onset of contractions. In our study, MMP-2 levels were decreased in women with preterm labor, yet it can be deduced that the onset of parturition would be associated with a fall in progesterone and/or the influence of progesterone receptors. Mendelson [21] suggests a possible connecting link between the inflammatory process of term labor

Table 6 Values of CRP, gestational age, sRAGE-M, sRAGE-UC, IL-6-UC, birth weight, IL-10-M, MMP-2-M, MMP-8-M, MMP-9-M, MMP-2-U, MMP-8-U, MMP-9-U for women with low and elevated concentrations of umbilical interleukin-6 (subgroup A and B) adjusted with gestational age (GA).

Variables	Subgroup A: IL-6-U ≤ 23		Subgroup B: IL-6-U > 23		Significance (gestational age-adjusted ANCOVA)
	n	Median	n	Median	
CRP	34	7.00 (2.30–12.00)	24	30.00 (12.50–53.50)	GA: P < 0.03
Gestational age	34	31.00 (28.00–33.00)	24	27.50 (25.8–29.00)	P < 0.0003*
sRAGE-M	34	672 (393–975)	24	548 (387–799)	GA: NS
sRAGE-U	34	2595 (1940–4030)	24	1746 (871–3771)	GA: NS
IL-6-U	34	6 (4.00–9.00)	24	218.60 (119.40–422.80)	GA: NS
Birth weight	34	1633 (1136–2348)	24	985 (916–1251)	GA: P < 0.0001
IL-10-M	34	4.70 (2.40–7.40)	24	12.67 (6.71–80.56)	GA: NS
MMP-2-M	34	164 (136–213)	24	117 (97–144)	GA: P < 0.05
MMP-8-M	34	42.00 (20.00–97.00)	24	55.20 (30.10–117.60)	GA: P < 0.02
MMP-9-M	34	1121 (612–1872)	24	1681 (1295–1921)	GA: NS
MMP-2-U	34	378.00 (340.00–431.00)	24	315.90 (248.90–346.30)	GA: NS
MMP-8-U	34	3.00 (1.80–4.60)	24	10.50 (5.70–38.00)	GA: NS
MMP-9-U	34	119.00 (78.00–207.00)	24	145.00 (76.00–247.00)	GA: NS

*Mann-Whitney test. Results are presented as median (interquartile range).

CRP = C-reactive protein, sRAGE-M = maternal serum sRAGE (pg/mL), sRAGE-U = umbilical serum sRAGE (pg/mL), IL-6-U = umbilical serum interleukin-6 (pg/mL), IL-10-M = maternal serum interleukin-10 (pg/mL), MMP-2,-8,-9-M = maternal serum MMPs (ng/mL), MMP-2,-8,-9-U = umbilical serum MMPs (ng/mL).

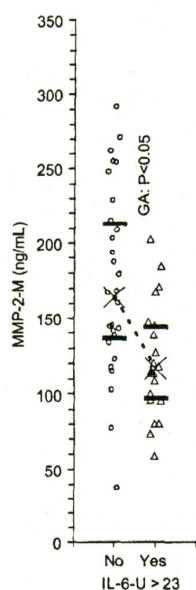


Figure 2 Analysis of maternal serum MMP-2 (MMP-2-M) concentrations (ng/mL) in relation to umbilical IL-6 concentrations (cut-off value of 23 pg/mL) in women with premature delivery. Values were adjusted to gestational age (GA). IL-6 = interleukin-6.

and the effect of progesterone. Increasing evidence suggests that the developing fetus may produce physical and hormonal signals that stimulate macrophage migration to the uterus, with the release of cytokines and activation of inflammatory transcription factors, such as NF- κ B and activator protein 1 (AP-1), which also is activated by myometrial stretch. Mendelson [21] postulated that the increased inflammatory response and NF- κ B activation promote uterine contractility via a) direct activation of contractile genes (e.g., COX-2, oxytocin receptor, and connexin 43) and b) impairment of the capacity of progesterone receptor (PR) to mediate uterine quiescence. PR function may be compromised near term by direct interaction with NF- κ B, altered expression of PR co-regulators, increased metabolism of progesterone within the cervix and myometrium, and increased expression of inhibitory PR isoforms. Alternatively, uterine quiescence could be regulated, in part, by PR antagonism of the inflammatory response. Progesterone administration suppressed fetal inflammatory response in fetal mononuclear cells *ex vivo* [31]. However, the exact relationship between the mechanisms of preterm labor and the effect of gestagens and their receptors is unknown. Our findings are in agreement with previously data [20] and suggest a possible abnormal regulation mechanism of the MMP-2 expression in preterm labor. More experiments will be required to investigate the details of this relationship. In contrast to other studies, we did not find any significant differences in the levels of MMP-8 in maternal serum between the two groups of women. However, the other investigators studied the levels of MMP-8 in AF. MMP-8 has been implicated in the mechanism of intra-amni-

otic inflammation and subsequent preterm birth [16, 22, 23, 26].

We found elevated levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in maternal serum of women with preterm labor compared to controls. Similar findings have been reported in AF and in the placenta [9, 13]. Gotsch et al. [9] proposed that IL-10 regulated the immune response *in vivo* by initiating actions that dampen inflammation. IL-10 effectively inhibited COX-2 expression and prostaglandin production in cultured placental explants from preterm labor deliveries, but not from term labor samples [12]. IL-10 also eliminated lipopolysaccharide induction of MMP-2 and -9 in the amnio-chorion [5]. These studies demonstrate the importance of IL-10 in opposing inflammation associated with preterm labor, and it remains to be investigated whether IL-10 treatment could be used to treat preterm labor.

Several studies have recently focused on the role of RAGE and its soluble variant sRAGE in obstetrics. Investigations measured AF concentrations of sRAGE [3, 28], and our group examined sRAGE levels in the maternal serum of women with preterm labor [6, 11]. In our previous studies, we showed that sRAGE serum levels changed during normal pregnancy as they were low in the first trimester, gradually increased to peak at 24–26 weeks before they fall again in the third trimester. In this study, we found sRAGE concentrations to be significantly decreased in preterm labor. Inflammation, infection and oxidative stress might contribute to the lowering of sRAGE levels in preterm labor [4, 17, 28].

The second part of our study examined changes within the group of women with preterm labor (Group 1) in relation to the presence or absence of FIRS. Antenatal identification of intrauterine infection/inflammation and of FIRS is of major relevance regarding short- and long-term morbidity. In contrast to acute chorioamnionitis, funisitis is a histological marker for a purely FIRS that might occur in the absence of maternal inflammatory response [26, 27]. The majority of previous publications studied the relationship between the presence of funisitis and the concentrations of various biochemical parameters measured in AF, using amniocentesis [1, 2, 23]. In agreement with Park et al. [23], we found significantly increased levels of IL-6 in umbilical blood samples of patients with funisitis. The levels of IL-6 vary during FIRS and are unaffected by GA. Elevated levels of IL-6 in umbilical blood samples are regarded as pathognomonic for FIRS [8]. We found a significant decrease in the maternal levels of MMP-2 in the group with funisitis and in the group with elevated umbilical IL-6 levels (subgroup B). There was a negative correlation between maternal concentrations of MMP-2 and the presence of funisitis. These findings suggest the possibility of using maternal MMP-2 levels in prenatal diagnosis of FIRS, in accord with the findings of lowered MMP-2 concentrations in women with preterm labor described in the first part of this study. The functional significance of these results is yet unknown.

Contrary to previous findings by Buhimschi et al. [1] who reported a significant decrease in umbilical blood concentrations of sRAGE during FIRS, we found no significant dif-

ferences in the concentrations of this parameter. This can be due to a relatively small size of our study population. However, we found a negative correlation between umbilical concentrations of sRAGE and the presence of funisitis.

In summary, recent discoveries suggest that MMPs may play an important role in the pathophysiology of preterm labor as well as in the process of term parturition. Further studies are required to elucidate the functional significance of these findings.

References

- [1] Buhimschi CS, Baumbusch MA, Dulay AT, Oliver EA, Lee S, Zhao G, et al. Characterization of RAGE, HMGB1, and S100 β in inflammation-induced preterm birth and fetal tissue injury. *Am J Pathol.* 2009;175:958–75.
- [2] Buhimschi CS, Buhimschi IA, Abdel-razek SS, Rosenberg VA, Thung SF, Zhao G, et al. Proteomic analysis of the amniotic fluid (AF) predicts funisitis and early-onset neonatal sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195(Suppl. 1):S170.
- [3] Buhimschi IA, Zhao G, Pettker CM. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) system in women with intraamniotic infection and inflammation. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:181.e1–13.
- [4] Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM. Inflammatory process in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol.* 2008;79:50–7.
- [5] Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ, LaFleur B. Interleukin-10 inhibition of gelatinases in fetal membranes: therapeutic implications in preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol.* 2001;98:284–8.
- [6] Germanová A, Koucký M, Hájek Z, Pařízek A, Zima T, Kalousová M. Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy. *Clin Biochem.* 2009; accepted in print Nov 10.
- [7] Goldman S, Weiss A, Shalev E. The effect of progesterone on gelatinase expression in the decidua and fetal membranes before and after contractions. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197:521.e1–7.
- [8] Gomez R, Romero R, Ghezzi F. The fetal inflammatory response syndrome (FIRS). *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:194–202.
- [9] Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP. The anti-inflammatory limb of the immune response in preterm labor, intra-amniotic infection/inflammation, and spontaneous parturition at term: a role for interleukin-10. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21:529–47.
- [10] Grammatopoulos DK. The role of CRH receptors and their agonists in myometrial contractility and quiescence during pregnancy and labor. *Front Biosci.* 2007;12:561–71.
- [11] Hájek Z, Germanová A, Koucký M, Zima T, Kopecký P, Vítková I, et al. Detection of feto-maternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study. *J Perinat Med.* 2008;36:399–404.
- [12] Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, Reddy P, Murphy S, Romero R. Evidence of interleukin-10-mediated inhibition of cyclo-oxygenase expression and prostaglandin production in preterm human placenta. *Am J Reprod Immunol.* 2006;55:19–27.
- [13] Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol.* 2000;164:5721–8.
- [14] Hudson BI, Harja E, Moser B, Schmidt AM. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and coronary artery disease. The next C-reactive protein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:879–82.
- [15] Kalousová M, Hodková M, Kazderová M, Fialova J, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis.* 2006;47:406–11.
- [16] Kim KW, Romero R, Park HS. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197:292.e1–5.
- [17] Lee SE, Romero R, Park IS, Seong HS, Park CW, Yoon BH. Amniotic fluid prostaglandin concentrations increase before the onset of spontaneous labor at term. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21:89–94.
- [18] Lemanczevicz A, Laudanski P, Kuc P, Pierzynski P, Kretowska M, Urban J. Matrix metalloproteinase-2 urine levels in preterm laboring patients. *Arch Perinat Med.* 2007;13:50–52.
- [19] Makrakis E, Grigoriou O, Kouskouni E. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in plasma/serum and urine of women during term and threatened preterm labor: a clinical approach. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003;14:170–6.
- [20] Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Gomez R, Edwin SS, et al. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;83:887–94.
- [21] Mendelson CR. Minireview: fetal-maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. *Mol Endocrinol.* 2009;23:947–54.
- [22] Park CW, Lee SM, Park JS, Jun JK. The antenatal identification of funisitis with rapid MMP-8 bedside test. *J Perinat Med.* 2008;36:497–502.
- [23] Park L, Roman KG, Kee KJ. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* 1998;4:1025–31.
- [24] Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg R, Tarkowski A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:817–24.
- [25] Rawlings ND, Barret AJ. Evolutionary families of metalloproteinases. *Meth Enzymol.* 1995;248:183–228.
- [26] Romero R, Espinoza J, Goncalves LF. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med.* 2007;25:21–39.
- [27] Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Nien NK. Inflammation in preterm and term labor and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11:317–26.
- [28] Romero R, Espinoza J, Hassan S. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and endogenous secretory RAGE (esRAGE) in amniotic fluid: modulation by infection and inflammation. *J Perinat Med.* 2008;36:388–98.
- [29] Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP. The preterm parturition syndrome. *BJOG.* 2006;113:17–42.
- [30] Schmidt AM, Yanc SD, Yana SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligand. *BBA – Mol Cell Res.* 2000;1498:99–111.

- [31] Schwartz N, Xue X, Elovitz MA, Dowling O, Metz CN. Progesterone suppresses the fetal inflammatory response ex vivo. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;201:211.e1–9.
- [32] Wear-Maggitti K, Lee J, Conejero A, Schmidt AM, Grant R, Breitbart A. Use of topical sRAGE in diabetic wounds increases neovascularization and granulation tissue formation. *Ann Plast Surg.* 2004;52:519–21.
- [33] Weiss A, Goldman S, Shalev E. The matrix metalloproteinases (MMPs) in the decidua and fetal membranes. *Front Biosci.* 2007;12:649–59.
- [34] Zhang H, Tasaka S, Shiraishi Y. Role of soluble receptor for advanced glycation end products on endotoxin-induced lung injury. *Am J Respir Care Med.* 2008;178:256–62.

The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Received January 5, 2010. Revised March 26, 2010. Accepted April 30, 2010. Previously published online August 13, 2010.

Detection of feto-maternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study*

Zdeněk Hájek^{1,}, Anna Germanová², Michal Koucký¹, Tomáš Zima², Pavel Kopecký¹, Marie Vítková³, Antonín Pařízek¹ and Marta Kalousová²**

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

² Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

³ Department of Pathology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

Abstract

Objective: The receptor for advanced glycation end products, RAGE, plays an important role in the pathogenesis of several diseases. sRAGE, soluble receptor for advanced glycation end products, is an inhibitor of the pathological effect mediated via RAGE. The aim of this study was to assess the usefulness of measuring sRAGE concentration in pregnant women with threatening preterm labor.

Methods: Serum levels of sRAGE, interleukin-6 (IL-6) and routine markers of inflammation were determined in 46 pregnant women with threatening preterm labor, 35 healthy pregnant women and 15 non-pregnant controls.

Results: Serum levels of sRAGE in healthy pregnant women were significantly lower than in non-pregnant controls (669 ± 296 vs. 1929 ± 727 pg/mL, $P < 0.05$). Women with threatening preterm birth had a significantly higher concentration of serum sRAGE in comparison with healthy pregnant women (819 ± 329 pg/mL vs. 669 ± 296 pg/mL, $P < 0.05$). Conversely, patients with PPROM had

significantly lower levels of sRAGE compared with patients with threatening premature labor (600 ± 324 pg/mL, $P < 0.05$). sRAGE correlated negatively with leukocyte counts ($r = -0.325$, $P < 0.05$).

Conclusions: sRAGE might be a new and promising marker of premature labor, especially with the symptoms of PPROM.

Keywords: Fetal inflammation; PPROM; preterm labor; soluble receptor for advanced glycation end products; sRAGE.

Introduction

Threatening preterm labor, especially preterm premature rupture of the membranes (PPROM), is one of the main complications of pregnancy [14, 17, 18]. This complication may indicate delivery because of suspected intra-amniotic infection. Recognition of the right time for termination of pregnancy is very difficult. Microbial invasion of the amniotic cavity is found in as many as 75% of patients with PPROM at the time of onset of labor [17]. Very often there is absence of systemic clinical signs of inflammation, such as fever, leukocytosis, and positive bacterial cultures. Most cases of histological inflammation are subclinical in nature [18]. Thus, the optimal combination of classical markers predicting infection/inflammation are followed in cases of threatening preterm birth, including leukocyte counts, C-reactive protein and neutrophil counts, and interleukin-6 [2, 21–23], as well as new markers such as sRAGE (soluble receptor for advanced glycation end products).

The receptor for advanced glycation end products (RAGE), is a multiligand receptor, a member of the immunoglobulin superfamily of cell surface molecules [12, 19, 20]. RAGE can be expressed on surface of various cells (e.g., monocytes, macrophages, neurons, endothelial cells, smooth muscle). This receptor can bind various ligands – advanced glycation end products, amyloid β -peptide, amphotericin, S100 proteins/calgranulins or HMGB1 (High Mobility Group Box 1) [6, 8, 12, 15, 19, 20].

The ligand-RAGE interaction results in the activation of intracellular signal transduction pathways of nuclear factor κ B (NF- κ B) and subsequently expression of genes for cytokines and growth factors (TNF- α , IL-1, PDGF, IGF-1, interferon γ), adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1),

*The study was supported by research project given by the Czech Ministry of Education MSM0021620807.

**Corresponding author:

Zdeněk Hájek, MD, PhD
Department of Obstetrics and Gynecology
1st Faculty of Medicine and General University Hospital
Charles University
Apolinářská 18
128 51 Prague 2
Czech Republic
Tel.: +420 224967414
Fax: +420 224922545
E-mail: hajekz@vfn.cz

induction of macrophage migration, stimulation of cells proliferation, up-regulation of pro-thrombotic pathways, increased synthesis of collagen IV, fibronectin and proteoglycans, and generation of oxidative stress [19, 20]. sRAGE, the soluble receptor for advanced glycation end products, is a naturally occurring inhibitor of pathological effect mediated via RAGE. It is a RAGE variant lacking the transmembrane domain and acting as a decoy [9, 12, 26].

RAGE plays an important role in pathogenesis of several diseases, like diabetes mellitus and its complications, vascular, cancer, and inflammatory diseases [9–11, 13, 16, 24, 26]. It was found that the uterus of women with preeclampsia overexpress RAGE [4, 5]. Concentration of sRAGE in amniotic fluid (AF) was measured by Buhimichi et al. [3] and found to be influenced by gestational age and probably unaffected by intraamniotic infection. However, maternal serum levels of sRAGE in pathological pregnancy have not been studied yet. The aim of this study was to assess the usefulness of measuring of sRAGE concentration in pregnant women with threatening preterm labor.

Subjects and methods

Study population

Forty-six pregnant women with symptoms of threatening preterm labor were examined and followed up in the Department of Gynecology and Obstetrics of the General University Hospital in Prague. Mean age of the patients was 29.9 ± 5.4 years. All women were between 24 and 34 weeks of gestation. A total of 26 patients with threatening preterm birth presented with contractions (4 and more per 30 min), 19 presented with advanced cervical dilatation, and 11 with PPRM in combination with or without vaginal bleeding. A total of 19 patients suffered from either *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, or *Mycoplasma hominis* infection whereas 15 patients had urinary infection and 20 had elevated infection markers (CRP, leukocyte count, neutrophils count). Six patients had a history of previous premature labor. At the end of follow-up, 24 patients delivered before 37 weeks of pregnancy, 20 women after 37 weeks, and two women were lost to follow-up.

A total of 35 healthy pregnant women, 15 of them in the 1st trimester, 8 in the 2nd trimester and 12 in the 3rd trimester as well as 15 non-pregnant individuals were studied as controls. Mean age of healthy pregnant controls was 30.5 ± 4.8 years and the mean age of non-pregnant controls was 26.6 ± 5.2 years.

Subjects with type 1 and 2 diabetes mellitus, gestational diabetes mellitus, decreased renal function and multiple pregnancies were not included in the study.

The study was approved by the Institutional Ethical Committee. All patients gave their informed consent prior to entering the study.

Samples

Blood was collected from the cubital vein, simultaneously with blood collection for routine examinations and centrifuged for 10 min at 1450 g. Serum was stored at -80°C for analysis performed within six months.

Laboratory parameters

sRAGE and IL-6 sRAGE and IL-6 were measured with ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Standard kits (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA) were used according to the protocol of the manufacturer. The plate was coated with monoclonal antibodies against sRAGE and IL-6, respectively, and polyclonal antibodies were used for detection. The results are expressed in pg/mL.

Routine biochemical parameters C-reactive protein was measured by turbidimetry (IMMAGE, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Other routine biochemical parameters were determined with standard clinical-chemistry methods recommended by the International Federation of Clinical Chemistry. Blood count was measured with an automated hematological analyzer T890 (Coulter Electronics, Inc., Hialeah, Florida, USA). Results of biochemical parameters are expressed as mean \pm SD.

Statistical analysis

Comparison of subgroups was performed with ANOVA and post-tests (Tukey's test). Association between parameters was determined by calculating Pearson and Spearman correlation coefficients. The results were considered as statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Association of sRAGE concentration and clinical and laboratory characteristics of patients

Pregnant women had significantly decreased concentration of serum sRAGE in comparison to non-pregnant controls. Symptomatic women with threatening preterm labor had significantly higher serum level of sRAGE compared to healthy pregnant women (Table 1, Figure 1).

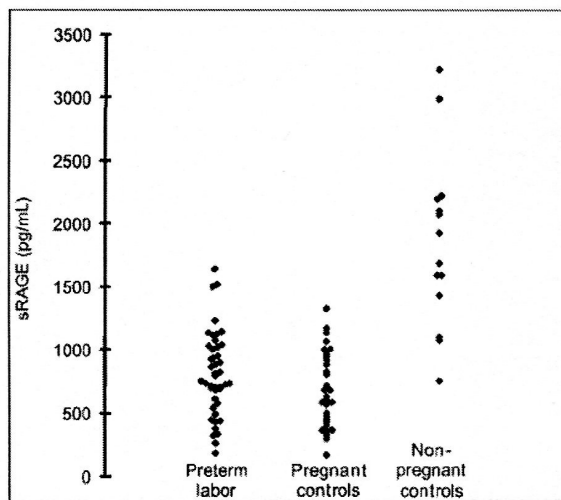
Women with PPRM had significantly lower level of sRAGE compared to women with contractions, cervical dilatation, and the entire group of patients with preterm labor. Otherwise, we did not find any differences in sRAGE concentrations in subgroups of patients with different symptoms (Table 2, Figure 2).

Symptomatic patients, who delivered within one month after first symptoms (most of them before 32 weeks' gestation), had a slightly decreased level of sRAGE compared to women who gave birth after a longer interval (most them after 32 weeks' pregnancy) from the first symptoms (Table 3). Additionally, serum levels of sRAGE

Table 1 sRAGE concentration in pregnant women and controls.

Group	Number of subjects	sRAGE (pg/mL)
Women with threatening preterm labor	46	819 ± 329 ^{*,**}
Healthy pregnant controls	35	669 ± 296 ^{**}
Healthy non-pregnant controls	15	1929 ± 727

sRAGE – soluble receptor for advanced glycation end products.
^{*}P < 0.05, vs. healthy pregnant controls.
^{**}P < 0.05, vs. healthy non-pregnant controls.



sRAGE – soluble receptor for advanced glycation end products

Figure 1. Scattergram of sRAGE in patients with threatening preterm labor, pregnant controls and non-pregnant controls.

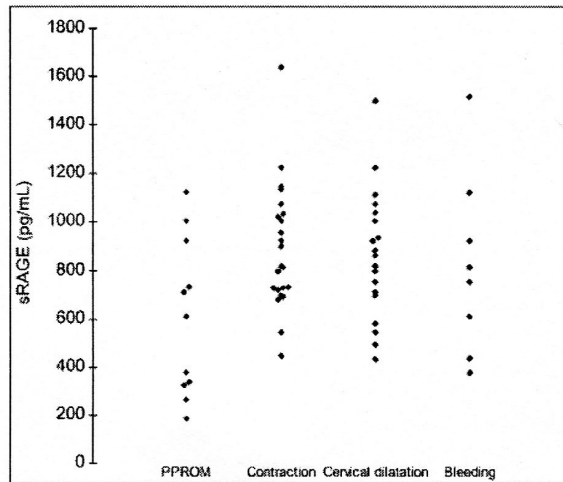
were slightly lower in the group of patients who had preterm birth compared to mothers who delivered at term (Table 3). However, both differences did not reach statistical significance.

Patients with significantly elevated leukocyte count (above $15 \times 10^9/L$) had a significantly decreased sRAGE serum level compared to patients with normal leukocyte count (Table 4) and sRAGE negatively correlated with the leukocyte count ($r = -0.325$, $P < 0.05$, Figure 3). In contrast, we did not find any differences between subgroups

Table 2 Association of sRAGE and symptoms of patients with threatening preterm labor.

Symptoms	n	sRAGE (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
Contractions	n=23	893 ± 257	2.4 ± 3.3
Cervical dilatation	n=19	864 ± 267	2.2 ± 3.5
PPROM	n=11	600 ± 325 ^{*,**}	5.6 ± 9.2

sRAGE – soluble receptor for advanced glycation end products.
 PPRM – preterm premature rupture of membrane.
^{*}P < 0.05, vs. patients with contractions.
^{**}P < 0.05, vs. patients with cervical dilatation.



sRAGE – soluble receptor for advanced glycation end products

Figure 2. Scattergram of sRAGE in patients with threatening preterm labor with different symptoms.

with different CRP concentrations (below and above 15 mg/L). Additionally, sRAGE did not correlate with CRP or with IL-6 in maternal serum.

There were no differences in sRAGE levels in patients with or without previous preterm labor, urinary tract infection, or Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis diagnosed by Hybrid Capture 2 CT/GC DNA Tests from cervical swab. s-RAGE levels in patients (12 patients) with Ureaplasma urealyticum infection did not differ in comparison to patients (7 patients) who had both Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections (850 ± 125 pg/mL vs. 757 ± 322 pg/mL). We did not find Chlamydia trachomatis infection in patients with preterm labor.

Association of IL-6 concentration and clinical and laboratory characteristics of patients

Interleukin-6 serum concentration in women with threatening preterm labor was 2.6 ± 5.0 pg/mL. Patients with PPRM had increased IL-6 concentration compared to patients with contraction, vaginal dilatation, and all patients with threatening preterm labor (Table 2).

Patients, who delivered before the 37th week of gestation, had significantly higher IL-6 serum levels compared to women who delivered at term. Patients who delivered within one month after the first symptoms had higher IL-6 levels in comparison to women who gave birth one month after manifestation of first symptoms as well (Table 3).

Women with threatening preterm labor and CRP serum concentration above 15 mg/L had significantly increased IL-6 concentration compared to women with CRP concentration below 15 mg/L (Table 4). The correlation between CRP and IL-6 was not statistically significant;

Table 3 Association of sRAGE and IL-6 with time of labor of patients with threatening preterm labor.

Time of labor		sRAGE (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
Preterm labor	n=24	811 ± 370	4.1 ± 6.7*
Term labor	n=20	864 ± 274	1.0 ± 0.4
Labor within 1 month after first symptoms	n=18	793 ± 354	4.6 ± 6.7
Labor after 1 month after first symptoms	n=26	864 ± 310	1.2 ± 1.0

sRAGE – soluble receptor for advanced glycation end products.

*P < 0.05, vs. term labor.

Table 4 Association of sRAGE concentration and other clinical characteristics of patients.

Patients		sRAGE (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
With positive STD	n=19	791 ± 266	2.2 ± 3.2
With negative STD	n=25	859 ± 363	2.5 ± 6.0
With urinary infection	n=15	862 ± 343	1.6 ± 1.6
Without urinary infection	n=31	798 ± 325	3.0 ± 6.0
With CRP above 15 mg/L	n=8	689 ± 295	5.1 ± 5.3*
With CRP under 15 mg/L	n=38	846 ± 332	2.0 ± 4.9
With leukocyte count above 15 × 10 ⁹ /L	n=7	607 ± 271**	8.3 ± 11.0
With leukocyte count under 15 × 10 ⁹ /L	n=39	857 ± 326	1.5 ± 2.0
With previous preterm labor	n=6	834 ± 465	1.7 ± 1.8
Without previous preterm labor	n=40	817 ± 311	2.7 ± 5.3

sRAGE – soluble receptor for advanced glycation end products.

STD – sexually transmitted diseases (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* infection).

CRP – C-reactive protein.

*P < 0.05, vs. patients with CRP under 15 mg/L.

**P < 0.05, vs. patients with leukocyte count under 15 × 10⁹/L.

however, patients with an increased CRP serum level had a significantly higher IL-6 serum concentration as well.

There were no differences in IL-6 concentrations in patients with or without *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, and *M. hominis*, as well as with urinary tract infection or previous preterm labor (Table 4).

Discussion

This is the first study dealing with maternal sRAGE serum concentration in pregnancy and focusing especially on threatening preterm labor. We showed that pregnant women have decreased serum levels of sRAGE. Women with threatening preterm labor have significantly higher sRAGE levels compared to healthy pregnant women, and conversely, women with PPRM have decreased levels of sRAGE. We did not find any association of sRAGE with *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* infection, or with urinary tract infection.

The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its soluble form is involved in the pathogenesis of many disease conditions and their complications, including vascular and inflammatory diseases or diabetic complications [19, 20]. Since oxidative stress and microinflammation are present in normal pregnancy and

are even more obvious in the pathological pregnancy and its complications [7], and since increased expression of RAGE was found in the uterus of women with preeclampsia [4, 5], changes of sRAGE levels were expected. Decreased sRAGE levels during normal pregnancy might represent a reaction to oxidative stress and microinflammation probably because of sRAGE consumption. However, the influence of hypervolemia and kidney hyperfiltration cannot be excluded and for further evaluation, more detailed analysis of sRAGE levels during pregnancy is required.

The role of sRAGE in the inflammatory process has already been studied. It has been shown that patients with rheumatoid arthritis have significantly lower serum levels of sRAGE and this, most likely, contributes to the tendency of inflammation [16]. Similar results by Wittkowski et al. [24] showed that sRAGE serum level is decreased and S100A12 serum concentration is increased in patients with Kawasaki disease, which may promote systemic inflammation and suggest that sRAGE/S100A12 ratio could be a useful sign in detection of infection. On the other hand, it was demonstrated that patients in severe sepsis or septic shock have a significantly higher serum level of sRAGE, and nonsurvivors have even more increased sRAGE concentration compared to survivors [1]. Information about renal function is

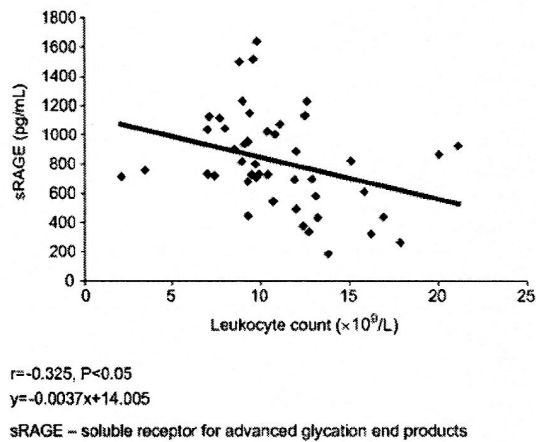


Figure 3. Correlation between sRAGE and leukocyte count

essential as kidney involvement may significantly affect sRAGE serum concentrations [11].

In our study, patients with PPROM have significantly lower levels of sRAGE compared to the entire group of patients with threatening preterm birth, patients with contractions or vaginal dilatation. In patients with threatened preterm birth with intact membranes the rate of positive amniotic fluid culture is about 12–13%, however, in women with PPROM the rate of positive amniotic fluid cultures is about 32% and during the latency period almost 75% [17], indicating possible activation of inflammation process and fall of sRAGE concentration in maternal blood. sRAGE correlated negatively with leukocyte count, in line with other studies. An inverse relationship between sRAGE, leukocyte count and other markers of inflammation (orosomuroid and fibrinogen) was also shown in hemodialysis patients [13] and, in another study, sRAGE inversely correlated to high sensitivity CRP in non-diabetic patients [25]. Lack of correlation of sRAGE and CRP and IL-6 might be explained by their high interindividual variability.

In summary, serum level of sRAGE in pregnancy is decreased. Women with threatening preterm labor have significantly higher sRAGE levels compared to healthy pregnant women and, conversely, women with PPROM have decreased levels of sRAGE. sRAGE is inversely related to leukocyte count, an indicator of inflammation. sRAGE might be a new and promising marker of premature labor, especially with the symptoms of PPROM. However, further studies are needed to confirm these results.

Acknowledgements

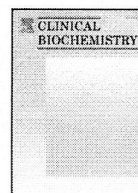
The study was supported by a Research Project given by the Czech Ministry of Education MSM 0021 20 807.

References

- [1] Bopp C, Hofer S, Weitz J, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, et al. sRAGE is elevated in septic patients and associated with patient outcome. *J Surg Res.* 2008;147:79–83.
- [2] Buhimschi CS, Sfakianaki K, Hamar BG, Pettker CM, Bahtiyar MO, Funai E, et al. A low vaginal “pool” amniotic fluid glucose measurement is a predictive but not a sensitive marker for infection in women with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:309–16.
- [3] Buhimschi IA, Zhao G, Pettker CM, Bahtiyar MO, Magloire LK, Thung S, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) system in women with intraamniotic infection and inflammation. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:1811–3.
- [4] Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, Konushi H, Kamada Y, Sasaki A, et al. Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitritive stress. *Placenta.* 2006;27:225–33.
- [5] Cooke CL, Brockelsby JC, Baker Davidge ST. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is elevated in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2003;22:173–84.
- [6] Falcone C, Campo I, Emanuele E, Buzzi MP, Geroldi D, Belvito C, et al. 374 T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2005;354:111–6.
- [7] Fialova L, Malbohan I, Kalousova M, Soukupova J, Krofta L, Stipek S, et al. Oxidative stress and inflammation in pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66:121–7.
- [8] Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, Gleason MR, Qu W, Lu Y, et al. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Gene Immun.* 2002;3:117–8.
- [9] Hudson BI, Harja E, Moser B, Schmidt AM. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and coronary artery disease. The next C-reactive protein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:879–82.
- [10] Hudson BI, Schmidt AM. RAGE a novel target for drug intervention in diabetic vascular disease *Pharm Res.* 2004;21:1079–86.
- [11] Kalousova M, Bartosova K, Zima T, Skibova J, Teplan J, Viklicky O. Pregnancy associated plasma protein A and soluble receptor for advanced glycation end products after kidney transplantation. *Kidney Blood Press Res.* 2007;30:31–7.
- [12] Kalousova M, Hodkova M, Kazderova M, Fialova J, Tesaf V, Dusilova-Sulkova S, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis.* 2006;47:406–11.
- [13] Kalousova M, Jachymova M, Mestek O, Hodkova M, Kazderova M, Tesar V, et al. Receptor for advanced glycation end products – soluble form and gene polymorphism in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:2020–6.
- [14] Lewis DF, Robichaux AG, Jaekle RK, Salas A, Canzonieri BJ, Horton K, et al. Expectant management of preterm premature rupture of membranes and nonvertex presentation: what are the risks? *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:566.e1–e6.
- [15] Lindholm E, Bakhtadze E, Sjogren M, Cilio CM, Agardh E, Groop L, et al. The 374 T/A polymorphism in the gene

- encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetologia*. 2006;49:2745–55.
- [16] Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A. Decreased level of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:142–4.
- [17] Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Sem Repr Med*. 2007;25:21–32.
- [18] Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *Br J Obstet Gynaecol*. 2006;113(Suppl. 3):17–42.
- [19] Schmidt AM, Hori O, Chen JX. Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice: a potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest*. 1995;96:1395–403.
- [20] Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1498:99–111.
- [21] Torbé A. Maternal plasma procalcitonin concentration in pregnancy complicated by preterm premature rupture of membranes. *Mediators Inflamm*. 2007;2007:35782.
- [22] Torbé A, Czajka R. Are vaginal fluid procalcitonin levels useful for the prediction of subclinical infection in patients with preterm premature rupture of membranes? *J Obstet Gynaecol Res*. 2005;31:464–70.
- [23] Trochez-Martinez RD, Smith P, Lamont RF. Use of C-reactive protein as a predictor of chorioamnionitis in preterm prelabour rupture of membranes: a systemic review. *Br J Obstet Gynaecol*. 2007;114:796–801.
- [24] Wittkowski H, Hirono K, Ichida F, Vogl T, Ye F, Yanlin X, et al. Acute Kawasaki disease is associated with reverse regulation of soluble receptor for advanced glycation end products and its proinflammatory ligand S100A12. *Arthritis Rheum*. 2007;56:4174–81.
- [25] Yang Y, Kim JY, Kang SM, Kim JS, Chae JS, Kim OY, et al. Association of Gly82Ser polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating levels of soluble RAGE and inflammatory markers in nondiabetic nonobese Koreans. *Metabolism*. 2007;56:199–205.
- [26] Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*. 2003;370:1097–109.

Received February 14, 2008. Revised May 2, 2008. Accepted May 26, 2008.



Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy

Anna Germanová^a, Michal Koucký^b, Zdeněk Hájek^b, Antonín Pařízek^b, Tomáš Zima^a, Marta Kalousová^{a,*}

^a Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

^b Department of Obstetrics and Gynaecology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 June 2009

Received in revised form 29 October 2009

Accepted 1 November 2009

Available online 10 November 2009

Keywords:

RAGE, receptor for advanced glycation end products
soluble receptor for advanced glycation end products, sRAGE
Pregnancy
Preterm labor
Preeclampsia

ABSTRACT

Objective: The receptor for advanced glycation end products, RAGE, has been implicated in pathogenesis of many diseases. Soluble RAGE, sRAGE, extracellular domain of RAGE, is new biomarker. The aim of the study was to determine sRAGE levels in physiological pregnancy and their changes in pregnancies complicated by preterm labor or preeclampsia.

Design and methods: Serum levels of sRAGE were determined in 79 healthy pregnant women, 42 pregnant women in preterm labor or with preeclampsia and 24 non-pregnant controls.

Results: sRAGE serum levels are decreased in physiological pregnancy compared to healthy non-pregnant controls ($p < 0.001$). Serum sRAGE concentrations are higher in the 2nd trimester of physiological pregnancy, compared to the 1st and 3rd trimesters of pregnancy ($p < 0.001$). sRAGE levels in women with preterm labor are decreased ($p < 0.05$) and correlate negatively with the leukocyte count ($r = -0.47$, $p < 0.05$). In women with preeclampsia, sRAGE is elevated ($p < 0.05$) and correlates with serum creatinine concentration ($r = 0.54$, $p < 0.05$) and with uric acid concentration ($r = 0.51$, $p < 0.05$).

Conclusion: Our results clearly demonstrate significant differences in serum sRAGE levels in physiological pregnancy and in pathological states in pregnancy, however, further studies are required demonstrate the usefulness and significance of sRAGE.

© 2009 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The receptor for advanced glycation end products, RAGE, is a multiligand transmembrane receptor, a member of the immunoglobulin superfamily [1,2]. RAGE is expressed on cell surface of numerous cell types, like macrophages, monocytes, endothelial cells, neurons, smooth muscles. RAGE recognizes several ligands, e.g. advanced glycation end products, amyloid- β peptide, S100 protein/calgranulins, HMGB1 (High Mobility Group Box 1) [1,3,4].

The RAGE–ligand interaction depends on the cell type and leads to activation of intracellular signal pathways of nuclear factor κ B (NF- κ B) and thus expression of genes for cytokines and growth factors (TNF- α , IL-1, PDGF, IGF-1, interferon γ), adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1), induction of migration of macrophages, stimulation of cells proliferation, up regulation of pro-thrombotic pathways, increased synthesis of collagen IV, fibronectin and proteoglycans, generation of oxidative stress [1,2].

Soluble receptor for advanced glycation end products, sRAGE, is a truncated form of RAGE—the extracellular domain. RAGE and sRAGE play a role in the pathogenesis of several chronic diseases like diabetes mellitus and its complications, vascular, cancer and inflammatory diseases. sRAGE is a new biomarker in these diseases [5–8]. It might act as a decoy by binding RAGE ligands and diminishes the pathological effect mediated via RAGE. sRAGE administration in experiments with mice completely suppressed diabetic atherosclerosis [9], topical application to standardized diabetic wounds in mice improved healing of diabetic wounds [10] and it was tested as a treatment modality in endotoxin-induced lung injury [11].

RAGE and sRAGE are recently in the center of interest in the field of obstetrics. It was described that uterus of women with preeclampsia overexpress RAGE [12,13]. Buhimschi et al. [14] measured sRAGE concentrations in amniotic fluid and found that sRAGE levels in amniotic fluid are probably influenced by gestational age of fetus and probably unaffected by intraamniotic infection. On the contrary, Romero et al. [15] discovered elevated sRAGE concentration in amniotic fluid with infection. Several studies including ours [16–18] focused on sRAGE levels in serum of women with pathological pregnancy. Our previous study described decreased serum sRAGE concentration in the women with threatening preterm labor with symptom of preterm premature ruptures of membranes [16]. Pertynska-Marczewska et al. showed lower sRAGE levels in pregnant

* Corresponding author. Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University in Prague, Karlovo nám. 32, 121 11 Prague 2, Czech Republic. Fax: +420 2249642848.

E-mail addresses: marta.kalousova@seznam.cz, mkalousova@hotmail.com (M. Kalousová).

women with diabetes mellitus [17]. However, dynamics of sRAGE changes during physiologic pregnancy has not been described in details yet. The aim of the study was to determine sRAGE levels in maternal serum in physiological pregnancies and their changes in pregnancies complicated by preterm labor or preeclampsia.

Subjects and methods

Study population

The studied group consisted of 144 women—79 healthy pregnant women in various weeks of pregnancy, 18 pregnant women suffering from preeclampsia, 24 women in time of preterm labor and 24 non-pregnant controls (Table 1).

Seventy-nine healthy pregnant women were examined and followed up during prenatal care in the Department of Gynecology and Obstetrics of the General University Hospital in Prague. Mean age of patients was 30.0 ± 3.4 years. The women were between 9th and 41st week of pregnancy. Twenty-seven of them were in the 1st trimester, 25 women were in the 2nd trimester and the rest of them in the 3rd one. sRAGE was measured just once in healthy pregnant women enrolled in the study together with other routine examinations. All of the women finally delivered at term. The women did not suffer any internal or pregnancy induced diseases and had no clinical signs of infection/inflammation. Healthy pregnant women had normal leukocyte count at the time of sRAGE assessment. They were not examined for sexually transmitted diseases (ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, chlamydia trachomatis infections).

Twenty-four healthy non-pregnant individuals served as controls. Mean age of non-pregnant controls was 28.0 ± 5.0 years.

Table 1
Association of sRAGE concentration and clinical characteristic of patients.

Healthy pregnant women	N = 79	727.4 ± 315.4 [‡]
In the 1st trimester	N = 27/79	640.7 ± 291.4 ^{‡,‡}
In the 2nd trimester	N = 25/79	936.0 ± 331.1 [‡]
In the 3rd trimester	N = 27/79	620.8 ± 225.5 ^{‡,‡}
Patients with preterm labor	N = 24	568.7 ± 340.0 ^{‡,♦}
Division according to symptoms		
With contractions	N = 14/24	644.84 ± 288.43
With PPRM	N = 8/24	297.46 ± 106.95 [‡]
With cervical dilatation or bleeding	N = 2/24	1079.75 ± 660.85
Division according to presence of STD		
With positive STD	N = 7/24	522.61 ± 302.04
With negative STD	N = 17/24	587.71 ± 361.73
Division according to CRP		
With CRP above 15 mg/L	N = 6/24	494.74 ± 196.91
With CRP under 15 mg/L	N = 18/24	542.07 ± 394.73
Division according to leukocyte count		
With leukocyte count above $15 \times 10^9/L$	N = 8/24	371.48 ± 171.20 [‡]
With leukocyte count under $15 \times 10^9/L$	N = 16/24	667.34 ± 363.89
Patients with preeclampsia	N = 18	1401.4 ± 1216.6 ^{‡,♦}
With proteinuria above 300 mg/L per 24 h	N = 10/18	1599.0 ± 1494.0
With proteinuria under 300 mg/L per 24 h	N = 8/18	1050.6 ± 772.9 [‡]
Healthy non-pregnant controls	N = 24	1937.9 ± 690.78

PPROM—preterm premature rupture of membrane.

STD—sexually transmitted diseases.

CRP—C-reactive protein.

[‡] $p < 0.05$, vs. healthy pregnant women in the 2nd trimester.

[‡] $p < 0.05$, vs. healthy pregnant women in the 2nd trimester.

[♦] $p < 0.05$, vs. healthy pregnant women.

^{*} $p < 0.05$, vs. patients with contractions.

[‡] $p < 0.05$, vs. patients with proteinuria above 300 mg/L 24 h.

^{*} $p < 0.05$, vs. patients with leukocyte count under $15 \times 10^9/L$.

Twenty-four women with symptoms of threatening preterm labor (contractions, vaginal dilatation, premature preterm rupture of membranes, bleeding) were enrolled in the study and sRAGE was examined at the time of preterm labor. The mean age of women was 29.6 ± 5.3 years. Fourteen of the patients initially presented with contractions, eight of them with premature preterm rupture of membranes, and remainder with vaginal dilatation or bleeding. Seven patients with symptoms threatening preterm labor suffered from sexually transmitted diseases (ureaplasma urealyticum or mycoplasma hominis, no patient suffered from chlamydia trachomatis infection). None of them suffered from urinary infection. Nine women with threatening preterm labor had elevated at least one of the inflammatory markers (CRP, leukocyte count). All patients with threatening preterm labor gave birth between 25th and 36th week of pregnancy.

Eighteen patients with symptoms of hypertension in pregnancy or preeclampsia were examined and followed up in Department of Gynecology and Obstetrics of the General University Hospital. The mean age of women was 30.4 ± 2.9 years. Hypertension in pregnancy was diagnosed in previously normotensive women with two repeated diastolic blood pressure measurements of 90 mm Hg or more and systolic blood pressure of 140 mm Hg or more. Ten women had proteinuria (300 mg/L daily) and seven of them had elevated serum concentration of uric acid. None of the women with preeclampsia suffered from any neurological symptoms (signs of eclampsia) or had laboratory signs of HELLP syndrome (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) (Table 2).

Subjects with type 1 and 2 diabetes mellitus, gestational diabetes mellitus, chronic kidney disease and multiple pregnancies were not included in the study.

The study was performed in accordance with principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethical Committee. All patients have given their informed consent prior to entering the study.

Samples

Blood from each patient and control was collected via puncture of the cubital vein, simultaneously with blood collection for routine examinations. Blood was centrifuged for 10 min at $1450 \times g$ and serum was stored at $-80^\circ C$. Analysis of all samples was performed within 6 months.

Laboratory assessments

sRAGE

sRAGE was measured with ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Standard kits (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA) were used according to the protocol of the manufacturer. The plate is coated with monoclonal antibodies against sRAGE and polyclonal antibodies are used for detection. The results are expressed in pg/mL.

Routine biochemical parameters

Routine biochemical parameters were determined with standard clinical-chemistry methods. C-reactive protein was measured turbidimetrically, uric acid was estimated by use of enzymatic method

Table 2
Biochemical characteristics of patients with preeclampsia.

Number of patients	18
Age (years)	30.3 ± 2.9
Serum creatinine concentration (μmol/L)	60.9 ± 16.6
Serum uric acid concentration (μmol/L)	333.5 ± 98.1
Proteinuria (g/24 h)	1.05 ± 2.44
Creatinine clearance (mL/s)	2.07 ± 0.41

with photometric detection, creatinine in serum was determined with Jaffé reaction, and protein in urine was assessed with pyrogallol red.

Blood count was measured with an automated hematological analyzer.

Statistical analysis

Results of biochemical parameters are expressed as mean \pm standard deviation. Comparison of subgroups was performed with Kruskal–Wallis test or with ANOVA (analysis of variance) and post-tests (Tukey's test). Association between parameters was determined by using Pearson and Spearman correlation coefficients. For statistical analyses, the software "Sigmastat", SYSTAT Software Inc., Chicago, USA, was used. The results were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Serum sRAGE concentration in physiological pregnancy

Serum sRAGE level in healthy pregnant women is significantly decreased in comparison to healthy non pregnant controls (727.4 ± 315.4 pg/mL vs. 1937.9 ± 690.8 pg/mL, $p < 0.001$). However, sRAGE concentration in healthy pregnant women varies during the pregnancy. sRAGE levels are significantly lower in the 1st trimester compared to the 2nd (640.7 ± 291.4 pg/mL vs. 936.0 ± 331.1 pg/mL, $p < 0.001$). sRAGE concentrations are significantly lower in the 3rd trimester in comparison to the 2nd trimester (620.8 ± 225.5 pg/mL vs. 936.0 ± 331.1 pg/mL, $p < 0.001$). There are no significant differences in sRAGE concentrations between 1st and 3rd trimester (Figs. 1 and 2). sRAGE serum levels in non-pregnant controls were significantly increased in comparison to sRAGE serum concentrations in pregnant women in 1st, 2nd or 3rd trimester (1937.9 ± 690.8 pg/mL vs. 640.7 ± 291.4 pg/mL, resp. 936.0 ± 331.1 pg/mL, resp. 620.8 ± 225.5 pg/mL, $p < 0.05$).

Serum sRAGE concentration in preterm labor and its correlations to clinical and laboratory parameters

Patients during preterm labor had significantly lower sRAGE levels (568.7 ± 340.0 pg/mL, $p < 0.05$) in comparison to healthy pregnant women (727.4 ± 315.4 pg/mL) as well as group of women, who were between 25th and 36th week of physiological pregnancy, the weeks of pregnancy when preterm labor occurred (754.1 ± 325.1 pg/mL). Patients, where preterm premature rupture of membranes appeared as a first sign, had decreased sRAGE concentration in comparison to patients where preterm labor manifested with contractions, vaginal dilation or bleeding (297.5 ± 107.0 pg/mL vs. 644.8 ± 283.4 pg/mL and 1049.8 ± 660.1 pg/mL, respectively, $p < 0.05$) (Table 1). sRAGE concentrations in women with bleeding or cervical dilation as first symptoms of preterm labor were statistically unjustifiable due to extremely small group of patients (two patients).

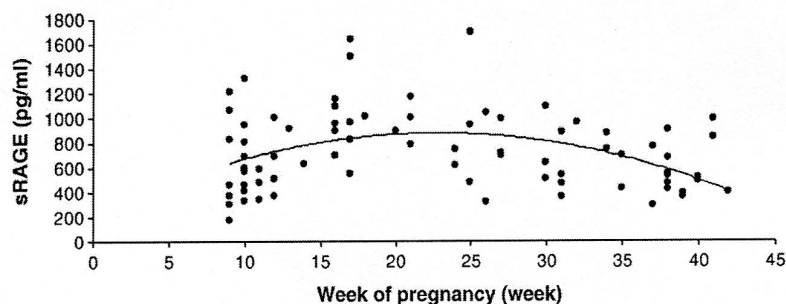


Fig. 1. Serum sRAGE concentration changes in pregnancy.

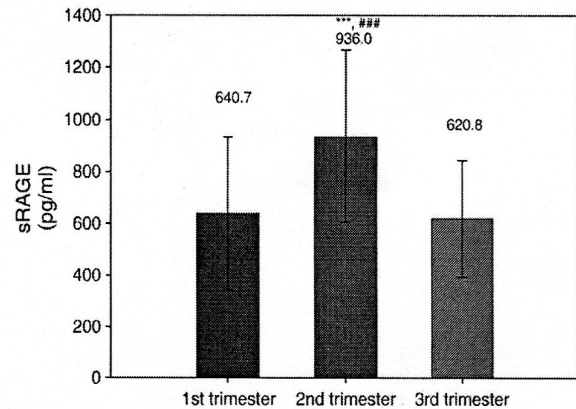


Fig. 2. sRAGE concentration in the 1st, 2nd and 3rd trimester. *** $p < 0.001$ vs. 1st trimester of physiological pregnancy. ### $p < 0.001$ vs. 3rd trimester of physiological pregnancy.

There were no differences in sRAGE concentrations between patients with or without STD (Table 1). Women in preterm labor with leukocyte count under $15 \times 10^9/L$ had significantly increased sRAGE serum levels compared to those who had elevated leukocyte count above $15 \times 10^9/L$ (Table 1). We did not find any differences between patients with or without elevated C-reactive protein. sRAGE negatively correlated with the leukocyte count ($r = -0.47$, $p < 0.05$, Pearson correlation), but not with CRP.

Serum sRAGE levels in women with preeclampsia and its correlation with clinical and laboratory parameters

Patients with gestational hypertension or preeclampsia had significantly higher sRAGE levels compared to healthy pregnant women (1401.4 ± 1216.6 vs. 727.4 ± 315.4 , $p < 0.05$) (Fig. 3). Ten patients with preeclampsia (proteinuria above 300 mg/L per 24 h) had increased sRAGE concentration compared to eight patients with pregnancy induced hypertension with proteinuria under 300 mg/L per 24 h (1599.0 ± 1494.0 pg/mL vs. 1050.6 ± 772.9 pg/mL, $p < 0.05$).

sRAGE correlated positively with serum creatinine concentration ($r = 0.54$, $p < 0.05$, Spearman correlation) and with uric acid concentrations ($r = 0.51$, $p < 0.05$, Spearman correlation). There was no relationship of sRAGE to proteinuria.

Discussion

In this study, we demonstrate changes in serum sRAGE levels during physiological pregnancy—decrease at the beginning of pregnancy, its significantly higher levels in the 2nd trimester and again fall in the 3rd trimester. In the pathological pregnancy with preterm labor we describe lower serum sRAGE levels, especially in patients with preterm premature rupture of membranes. In according to previous

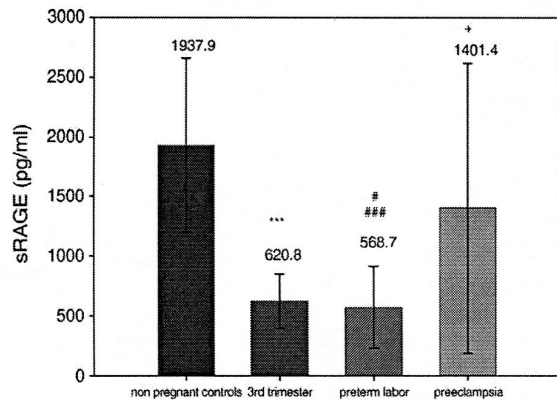


Fig. 3. sRAGE concentrations in 3rd trimester of physiological pregnancy, in preterm labor and preeclampsia. *** $p < 0.001$ vs. non-pregnant controls, patients with preeclampsia and 2nd trimester of physiological pregnancy, # $p < 0.05$ vs. healthy pregnant controls, patients with preeclampsia, ### $p < 0.001$ vs. non-pregnant controls, + $p < 0.05$ vs. non-pregnant controls, healthy pregnant controls, patients in preterm labor.

studies, we found higher sRAGE serum concentrations in women with preeclampsia.

Pregnancy is a period, when oxidative stress is expected due to increased oxygen requirement and high energy demand. Several studies have shown elevated oxidative stress markers during physiological pregnancy [19,20] along with inflammatory markers [19,21]. Significant decrease in sRAGE serum concentrations in the beginning of pregnancy, shown in our study, might represent consumption of sRAGE in the presence of higher concentration of proinflammatory molecules and yet not sufficient compensating mechanisms. Our results demonstrate raising serum sRAGE levels up to peak, which occurs in about 24th–26th week of pregnancy. sRAGE concentrations then decrease until the end of pregnancy. Changes of sRAGE concentrations in the 2nd trimester can be caused by overproduction in proinflammatory background and up-regulation of sRAGE, however altered function of immune system should be considered. Immune system of pregnant women undergoes delicate alterations towards immunosuppression [22,23]. Although, mechanism of labor onset is still unknown, several studies [24–26] demonstrated participation of inflammatory cells and proinflammatory cytokines on the labor onset. The fall in sRAGE serum in the end of pregnancy might be connected to initialization of this process and again consumption of sRAGE by overproduction of proinflammatory molecules. Finally, influence of hypervolemia and changes of renal function, i.e. hyperfiltration, or hormonal changes during pregnancy should be considered.

Looking for the markers of threatening preterm labor and infections, the major cause of neonatal morbidity and mortality, sRAGE came to centre of interest in obstetrics. First, the role of RAGE in the inflammatory process is generally accepted, second, altered sRAGE levels were shown in several inflammatory states—rheumatoid arthritis, Kawasaki disease and sepsis [8,27,28]. Several studies focused on sRAGE concentrations in the amniotic fluid [14,15], but only our study examined sRAGE level in maternal serum of women with threatening preterm labor [16]. In this pilot study, in small number of patients, on the contrary to the present one, serum sRAGE levels in women with threatening preterm labor were higher compared to healthy pregnant controls. These different results are probably caused by different time of sample collections. Our previous study describes sRAGE concentration in connection to first symptoms of preterm labor, on the contrary, in this study we are focusing on sRAGE serum levels during preterm labor in progress. However, in women with premature preterm rupture of membranes sRAGE in maternal serum is decreased irrespectively of the time of blood collection. A trend to lower sRAGE levels from the 26th week toward

birth is obvious from our results suggesting a physiological tendency to lower sRAGE level during birth. Inflammation, infection and oxidative stress [29,30] might contribute to lowering of sRAGE levels during preterm labor. In accordance to our previous results [16] we show an inverse relationship of sRAGE to inflammation—a negative correlation with the leukocyte count. Unlike other studies [18,31], we did not find any correlation of sRAGE with serum CRP, probably due to high inter-individual variability.

The role of soluble receptor for advanced glycation end products has been studied also in other chronic diseases. In essential hypertension sRAGE concentrations were lower [32], but significantly increased levels were observed in patients with decreased renal function [5]. Preeclampsia is another pregnancy induced disorder characterized by hypertension and proteinuria. Even if the etiopathogenesis of preeclampsia is still not clearly understood, role of oxidative stress was shown. Accumulation of AGEs [12] and increased expression of receptor for advanced glycation end products in uterus of women with preeclampsia [13] was demonstrated. In our study, in line with the findings of Fasshauer et al. [18], we show significantly increased sRAGE serum concentrations in comparison to healthy pregnant controls. Although preeclampsia is characterized by hypertension, and we could expect decreased sRAGE serum levels as in essential hypertension, the role of altered renal function is probably more important here, even if we do not know whether this increase is caused just by altered renal function or upregulation of sRAGE [5]. In case of preeclampsia the role of angiotensin and its receptors in the pathogenesis should be considered. Indeed, angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic patients increases sRAGE production and secretion to plasma [33,34]. In our study we found a positive correlation of sRAGE concentration and serum creatinine concentration which is consistent with previous knowledge [5,32]. We did not detect any correlation of sRAGE with proteinuria but we describe a positive correlation with uric acid serum level. Uric acid serum concentration is nowadays understood as marker of severity of preeclampsia. Due to its ability to promote inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction, its active role in the pathogenesis of preeclampsia is proposed [35]. sRAGE could become a new marker of seriousness of preeclampsia, however further studies are needed to confirm these results.

In summary, sRAGE serum levels during physiological pregnancy are changing. They are low in the beginning of pregnancy, then they rise up to 24th–26th week of pregnancy and again fall in the 3rd trimester. sRAGE concentration is decreased in preterm labor, especially when premature preterm rupture of membranes is the first sign of the preterm labor. Serum sRAGE in women with preterm labor is inversely correlated with the leukocyte count, the marker of infection. Serum sRAGE level in women with preeclampsia is significantly increased and sRAGE positively correlates with serum creatinine levels and serum uric acid concentrations. Our results clearly demonstrate significant differences in serum sRAGE levels in physiological pregnancy and in pathological states in pregnancy, however, further studies are required demonstrate the usefulness and significance of sRAGE.

Acknowledgment

The study was supported by research project given by the Czech Ministry of Education MSM0021620807.

References

- [1] Schmidt AM, Hori O, Chen JX, et al. Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM – 1) in cultured human endothelial cells and in mice: a potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995;96:1395–403.
- [2] Schmidt AM, Yanc SD, Yana SF, Stern DM. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligand. *BBA – Mol Cell Res* 2000;1498:99–111.

- [3] Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in non diabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1032–7.
- [4] Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, et al. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun* 2002;3:125–35.
- [5] Kalousová M, Hod'ková M, Kazderová M, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis* 2006;47:406–11.
- [6] Hudson BI, Harja E, Moser B, Schmidt AM. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and coronary artery disease. The next C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:879–82.
- [7] Hudson BI, Schmidt AM. RAGE: a novel target for drug intervention in diabetic vascular disease. *Pharm Res* 2004;21:1079–86.
- [8] Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg R, Tarkowski A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther* 2005;7:817–24.
- [9] Park L, Roman KG, Kee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 1998;4:1025–31.
- [10] Wear-Maggitti K, Lee J, Conejero A, Schmidt AM, Grant R, Breitbart A. Use of topical sRAGE in diabetic wounds increases neovascularization and granulation tissue formation. *Ann Plast Surg* 2004;52:519–21.
- [11] Zhang H, Tasaka S, Shiraiishi Y, et al. Role of soluble receptor for advanced glycation end products on endotoxin-induced lung injury. *Am J Respir Care Med* 2008;178:256–62.
- [12] Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, et al. Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nutritive stress. *Placenta* 2006;27:225–33.
- [13] Cooke CL, Brockelsby JC, Baker PN, Davidge ST. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is elevated in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003;22:173–84.
- [14] Buhimschi IA, Zhao G, Pettker CM, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) system in women with intraamniotic infection and inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(181):e1–e13.
- [15] Romero R, Espinoza J, Hassan S, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and endogenous secretory RAGE (esRAGE) in amniotic fluid: modulation by infection and inflammation. *J Perinat Med* 2008;36:388–98.
- [16] Hájek Z, Germanová A, Koucký M et al. Detection of feto-maternal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): results of a pilot study. *J Perinat Med* 2008;36:399–404.
- [17] Pertynska-Marczewska M, Glowacka E, Sobczak M, Cypryk K, Wilczynski J. Glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and cytokines in diabetic and non-diabetic pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2009;61:175–82.
- [18] Fasshauer M, Seeger J, Waldeyer T, et al. Endogenous soluble receptor for advanced glycation end products is increased in preeclampsia. *J Hypertens* 2008;26:1824–8.
- [19] Fialová L, Malbohan I, Kalousová M, et al. Oxidative stress and inflammation in pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2006;66:121–7.
- [20] Arikan S, Konukoglu D, Arican C, Akcay T, Davas T. Lipid peroxidation and antioxidant status in maternal and cord blood. *Gynecol Obstet Invest* 2001;51:145–9.
- [21] Belo L, Santos-Silva A, Rocha S, et al. Fluctuations in C-reactive protein concentration and neutrophil activation during normal human pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;123:46–51.
- [22] Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:279–95.
- [23] Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immun* 2002;21:471–95.
- [24] Keelan JA, Marwin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LM, Mitchell MD. Cytokine abundance in placental tissues evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1530–6.
- [25] Osman I, Young A, Ledingham MA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Human Reprod* 2003;9:41–5.
- [26] Young A, Thomson AJ, Ledingham M, Jordan F, Greer IA, Norma JE. Immunocalization of proinflammatory cytokines in myometrium, cervix, and fetal membranes during human parturition at term. *Biol Reprod* 2002;66:445–9.
- [27] Bopp C, Hofer S, Weitz J, et al. sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J Surg Res* 2008;147:79–83.
- [28] Wittkowski H, Sturrock A, van Zoelen MA. Neutrophil – derived S100A12 in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2007;35:1369–75.
- [29] Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Nien NK. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:317–26.
- [30] Lee SE, Romero R, Park IS, Seong HS, Park CW, Yoon BH. Amniotic fluid prostaglandin concentrations increase before the onset of spontaneous labor at term. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:89–94.
- [31] Jang Y, Kim JY, Kang SM, et al. Association of the Gly82Ser polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating levels of soluble RAGE and inflammatory markers in nondiabetic and nonobese Koreans. *Metabolism* 2007;56:199–295.
- [32] Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2005;23:1725–9.
- [33] Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:82–93.
- [34] Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2363–72.
- [35] Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta* 2008;29:67–72.