

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie  
Studijní obor: Biochemie



**Ján Račko**

## **Diagnostika těhotenských patologií**

Diagnostics of pathologies in pregnancy

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.  
Školitel konzultant: Ing. Andrea Kestlerová

Praha, 2020

## **Prohlášení**

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. a školitele konzultanta Ing. Andree Kestlerové a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.“

V Praze dne .....

Podpis: .....

Ján Račko

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval pánovi prof. RNDr. Jířimu Hudečkovi, CSc. za vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Andree Kestlerové za pomoc a odborné vedení v experimentální části. V neposlední řadě děkuji své rodině za to, že vždy stojí při mně, a své přítelkyni a kolegyni Antoniane Žufic.

## **Abstrakt**

Problematika spontánního potratu je v dnešní době pořád aktuálním tématem. V České republice je každoročně tímto způsobem ukončeno v průměru patnáct tisíc gravidit. Nejčastějšími příčinami jsou genetické aberace nebo jiné poškození plodu, jako je např. syndrom dechové tísně, nebo syndrom LUTO. Potrácení je možné předejít časnou diagnostikou v prvním trimestru a také za pomoci chirurgických zákroků jako je např. cervikální cerkláž. Annexin V, PAPP-A a hCG jsou považovány za vhodné biochemické markery pro časnou diagnostiku. V této práci je na základě literárních dat rozebírána problematika potratovosti a experimentálně zkoumána možnost využití annexinu V jako vhodného biomarkeru pro časnou diagnostiku a prevenci spontánního potratu.

## **Klíčová slova**

Imunochemická diagnostika, ELISA, potraty, falešná gravidita, biomarkery, annexin V

## **Abstract**

The problem of spontaneous abortion is still a relevant issue today. In the Czech Republic, on a yearly average, 15,000 pregnancies end up being miscarriages. The most common causes are genetic aberrations or other kinds of fetal damage, such as respiratory distress syndrome or LUTO syndrome. Miscarriage can be prevented by an early diagnosis in the first trimester as well as surgical procedures such as cervical cerclage. Annexin V, PAPP-A and hCG are biochemical markers that are considered suitable for an early diagnosis. This work discusses abortion based on sources from literature, whilst also presenting and considering the use of annexin V as a suitable biomarker for an early diagnosis and prevention of abortion.

## **Key words**

Immunochemical diagnostics, ELISA, abortions, false gravidity, biomarkers, annexin V

## Obsah

1	Teoretický úvod .....	8
1.1	Fyziologická gravidita.....	8
1.1.1	Přehled vývoje těla plodu v jednotlivých lunárních měsících gravidity ....	8
1.1.2	Přehled vývoje orgánů plodu.....	9
1.2	Problematika potratů .....	11
1.2.1	Biochemická gravidita.....	11
1.2.2	Falešná gravidita .....	12
1.2.3	Spontánní potrat.....	13
1.2.4	Zamlklý potrat.....	16
1.2.5	Indukovaný potrat .....	17
1.3	Problematika potratů v České republice a v zahraničí .....	20
1.4	Možnosti diagnostiky a prevence potratů a jejich vývoj v čase .....	23
1.4.1	Screeningové testy v 1. trimestru a genetické poruchy .....	24
1.5	Biochemické markery.....	26
1.5.1	Annexin V a jeho rodina.....	26
1.5.2	PAPP-A .....	30
1.5.3	hCG a volná $\beta$ podjednotka hCG.....	30
1.6	Vliv toxoplazmózy na průběh gravidity.....	31
2	Cíle práce .....	33
3	Materiál a metody .....	34
3.1	Použitý materiál a pomůcky .....	34
3.2	Příprava krevního séra pro analýzu.....	35
3.3	ELISA testy krevních sér pro stanovení annexinu V .....	35
3.3.1	Charakteristika výběrového souboru.....	36
3.4	Statistické zpracování dat .....	36
4	Výsledky .....	38
5	Diskuze .....	40
6	Souhrn.....	41
	Seznam literatury .....	42

## Seznam zkratek

<b>hCG</b>	Lidský choriový gonadotropin (ang. Human Chorionic Gonadotropin)
<b>UZ</b>	Ultrazvuk
<b>TH</b>	Pomocná T buňka (ang. T Helper)
<b>TC</b>	Cytotoxická T buňka (ang. T Cytotoxic)
<b>CD4+</b>	Glykoprotein na povrchu TH buněk
<b>CD8+</b>	Transmembránový glykoprotein na povrchu TH buněk
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>TNF</b>	Tumor nekrotizující faktor (ang. Tumor Necrosis Factor)
<b>HLA-G</b>	Lidský leukocytární antigen G (ang. Human Leukocyte Antigen G)
<b>MHC</b>	Transmembránový glykoprotein na povrchu T buňky (ang. Major Histocompatibility Complex)
<b>LUTO</b>	Fetální obstrukce dolních močových cest (ang. Lower Urinary Tract Obstruction)
<b>RDS</b>	Syndrom dechové tísně (ang. Respiratory Distress Syndrome)
<b>GT</b>	Gestační Týden
<b>RTG</b>	Rentgen
<b>D&amp;E</b>	Dilatace a evakuace
<b>ČNR</b>	Česká Národní Rada
<b>QF-PCR</b>	Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (ang. Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction)
<b>ANXA</b>	Annexin
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2 (ang. Phospho Lipase)
<b>NOS</b>	tzv. NO-synthasa (ang. Nitric Oxide Synthase), E.C. 1. 14. 13. 39
<b>PAPP-A</b>	Pappalysin-1 (ang. Pregnancy Associated Plasma Protein)
<b>IgA</b>	Imunoglobulin A
<b>RPM</b>	Otáčky za minutu (ang. Rotations Per Minute)
<b>ELISA</b>	Imunologická metoda na detekci a stanovení antigenů (ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Fyziologická gravidita

Fyziologická gravidita je přirozený proces, ve kterém dochází k vývoji embrya za normálního fyzického i psychického ovlivnění ženy, avšak bez vážnějších zdravotních komplikací. Potvrzení gravidity může být indikováno několika typy vyšetření, např. pozitivními výsledky při testu moči a potvrzení krevním testem, ultrazvukem nebo detekcí srdečního rytmu plodu<sup>1</sup>. Například lidský choriový gonadotropin (hCG) je hormon, který bude přítomen v krvi ženy od časného početí. Hladiny hCG lze zjistit v ženské moči asi týden po zmeškané menstruaci<sup>5</sup>.

Typická gravidita trvá 40 týdnů od prvního dne posledního menstruačního období až po narození dítěte<sup>2</sup>. Gravidita se obecně rozděluje na tři trimestry: první trimestr (1. - 13. týden), druhý trimestr (14. - 27. týden) a třetí trimestr (28. - 40. týden). Během prvního trimestru se normálně objevují tyto znaky: extrémní únava, podrážděný žaludek bez zvracení (známé taky jako ranní nevolnost), bolesti hlavy a pálení žáhy<sup>3</sup>.

Nejdůležitější procesy základní diferenciací fetálních buněk probíhají během prvního trimestru, takže jakékoli poškození plodu během tohoto období pravděpodobně povede k potratu (kapitola 1.2) nebo vážnému postižení<sup>1</sup>.

### 1.1.1 Přehled vývoje těla plodu v jednotlivých lunárních měsících gravidity

**Konec 1. měsíce:** embryo dosahuje délky 8 mm, rozeznáváme objemný hlavový konec, jsou vytvořeny základy pro oči, uši, nos a na výběžcích končetin základy pro prsty<sup>4</sup>.

**Konec 2. měsíce:** embryo dosahuje délky 3 cm, hmotnosti cca 5 g. Rozeznáváme lidský tvar s velkou hlavovou částí, zřetelné končetiny a naznačeny prsty. Při UZ vyšetření se prokazuje srdeční akce<sup>4</sup>.

**Konec 3. měsíce:** fetus dosahuje délky 9 cm a hmotnosti 20 g. Na končetinách rozeznáme prsty, je vytvořen chrupavčitý základ kostry, kloaka je rozdělena, pohlaví je diferenciováno. Je vytvořena placenta<sup>4</sup>.



**Konec 4. měsíce:** délka plodu je 16 cm, hmotnost 120 g. Je vytvořen kožní kryt těla (kůže je svrstělá, jemná, červená, není vytvořen podkožní tukový polštář), na povrchu těla se objevuje chmýří – lanugo<sup>4</sup>.

**Konec 5. měsíce:** délka plodu je 25 cm, hmotnost 250 g. Začíná růst vlasů, nehtů, podkožní tukový polštář je tenký. Těhotná žena začíná vnímat pohyby plodu<sup>4</sup>.

**Konec 6. měsíce:** délka plodu je 30 cm, hmotnost 600 g. Začínají se otevírat oči<sup>4</sup>.

**Konec 7. měsíce:** délka plodu je 35 cm, hmotnost 1200 g<sup>4</sup>.

**Konec 8. měsíce:** délka plodu 40 cm, hmotnost 1800 g. Je vytvořeno osifikační jádro v dolní epifýze stehenní kosti<sup>4</sup>.

**Konec 9. měsíce:** délka plodu je 45 cm, hmotnost 2700 g, mizí vrásky v obličeji, kůže je napjatá, je vyvinutý tukový podkožní polštář, lanugo z obličeje a břicha mizí<sup>4</sup>.

**Konec 10. měsíce:** plod vykazuje všechny znaky zralosti, délka je 48–50 cm, hmotnost 3000–3600 g. Kůže je napjatá, růžová, lanugo je jen na zádech, kůže je pokryta mázkem (*vernix caseosa*). Jsou vyvinuty chrupavky nosní, ušní, nehty dosahují či přesahují špičky prstů, švy mezi lebečními kostmi jsou úzké, fontanely malé, varlata u chlapců sestupují do šourku. U děvčat velká labia přesahují malá labia a šterbinovitě uzavírají poševní vchod<sup>4</sup>.

### 1.1.2 Přehled vývoje orgánů plodu

**První trimestr:** Na začátku prvního trimestru se začínají formovat plíce, srdce, genitálie a orgány vnitřního ucha. Na konci prvního trimestru jsou tyto orgány vyvinuty<sup>5</sup>.

**Druhý trimestr:** V průběhu druhého trimestru jsou vyvinuty ledviny které začínají produkovat moč, také se rychle vyvíjí mozek a plíce<sup>5</sup>. V plicích dochází k tvorbě antiatelektatického faktoru – surfaktantu (směs lecitinu a sfingomyelinu)<sup>4</sup>.

V druhém trimestru je možné vyšetření plodů na základě plnosti jejich močového měchýře. Tímto vyšetřením se dá předejít fetální obstrukci dolních močových cest (tzv. LUTO). Fetální obstrukce dolních močových cest je závažný stav, který obvykle

vede k výrazné perinatální morbiditě a mortalitě. Jednou z charakteristických prenatalních znaků LUTO je zvětšený močový měchýř s oboustrannou obstrukční uropatií. Zatímco mírné formy onemocnění vedou k minimálním klinickým následkům, závažnější formy obvykle vedou k oligohydramniím, dysplastickým změnám v ledvinách plodu a nakonec k sekundární plicní hypoplasii<sup>6</sup>.

Diagnostika tohoto stavu je možná za pomoci ultrazvukového vyšetření a také za pomoci magnetické rezonance<sup>7</sup>.

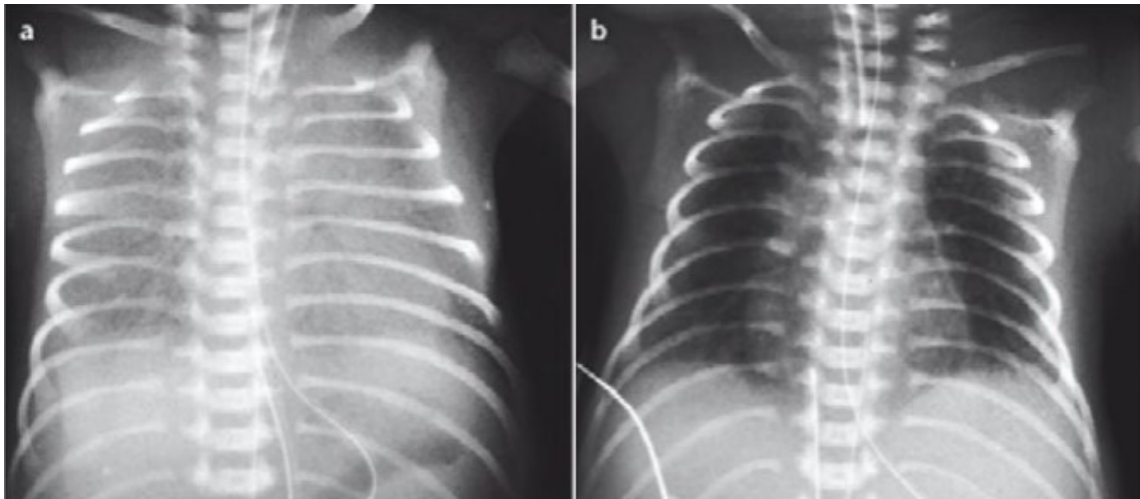
**Třetí trimestr:** Během třetího trimestru se začínají vyvíjet jednotlivé části mozku a plíce jsou již plně vyvinuty a okamžitě po porodu začínají fungovat<sup>5</sup>.

S nedokonalým vyvinutím plic souvisí tzv. RDS, syndrom dechové tísně. Tento syndrom vzniká následkem nedostatku surfaktantu u nedonošených novorozenců a klinicky se projevuje bezprostředně po porodu jako rychle progredující dechová nedostatečnost skoro výlučně v gestačním věku pod 35. GT (porodní hmotnost <2 kg)<sup>8</sup>.

Surfaktant snižuje povrchové napětí plicních alveolů, tím stabilizuje alveolární systém a zabrání tak kolapsu alveolů během expirační fáze. Při nedostatku surfaktantu je tento mechanismus porušen<sup>8</sup>.

Nedostatek surfaktantu vede ke vzniku atelektáz, snížení plicní poddajnosti a následkem hypoventilace dochází k hypoxemii, stoupá hladina CO<sub>2</sub>, následuje systémová hypotenze a vazokonstrikce plicních cév (Obr. 1). Tímto mechanismem vznikají plicní hypoperfuze, intrapulmonální zkratky a pravo-levé zkratky na úrovni srdeční síně. Acidóza, hypoxie a zhoršená plicní látková výměna brání postnatálně nastupující tvorbě surfaktantu de-novo<sup>8</sup>.

Léčba RDS může být symptomatická, která spočívá v podání kyslíku a umělé plicní ventilaci, v infuzní terapii u oběhové nestability a velmi důležitá je šetrná manipulace s dítětem. Léčba může být i kauzální, která představuje podání surfaktantu vepřového nebo hovězího. Po podání surfaktantu dojde ke zlepšení oxygenace a ke zlepšení výměny krevních plynů, snižuje se incidence pneumotoraxu a sníží se i mortalita, která je spojena s RDS a vznikem bronchopulmonální dysplasie<sup>8</sup>.



**Obr. 1: RTG snímek hrudníku novorozence s RDS před podáním surfaktantu (a) a po podání surfaktantu (b).** Snímek "a" byl pořízen 2 hod. po porodu a inkubaci, mléčná snížená transparence a neostře kontury plic značí syndrom dechové tísně. Snímek "b" byl pořízen 4 hod. po podání surfaktantu, zlepšení transparence plic značí klinické zlepšení stavu. *(upraveno dle <sup>8)</sup>)*

## 1.2 Problematika potratů

Těhotenství ukončené potratem je opakem fyziologického těhotenství. Potrat, neboli také smrt plodu může nastat z různých příčin a proto se potraty dělí na několik typů. Jedním z nich je spontánní potrat, jehož pravým opakem je potrat indukovaný (dále rozepsáno v kapitolách 1.2.3 a 1.2.5). Převážná většina potratů je způsobena jednou nebo více chromozomálními abnormalitami ve velmi raných embryích. K tomu může dojít, když je abnormální vajíčko oplodněno normální spermií, když abnormální spermie oplodní normální vajíčko, nebo když dojde k chybě během dělení buněk po normálním oplodnění<sup>9</sup>. Mezi potraty řadíme i porod mrtvého plodu.

Potrat i porod mrtvého plodu představují ztrátu těhotenství, liší se však podle toho, kdy ke ztrátě došlo. Potrat je obvykle definován jako ztráta dítěte před 20. týdnem těhotenství a porod mrtvého plodu je ztráta dítěte po 20. týdnu těhotenství - podle CDC, USA<sup>10</sup>.

### 1.2.1 Biochemická gravidita

Biochemická gravidita je stav, při kterém ženě vyjde pozitivně těhotenský test, ale plod není detekovatelný ultrazvukem. Ve skutečnosti se jedná o velmi časný spontánní potrat. Těhotenské testy jsou v dnešní době velmi citlivé, proto je možné tento jev sledovat<sup>11</sup>.

Současná generace testů je založena na monoklonálních protilátkách proti volné  $\beta$  podjednotce hCG, které prakticky eliminují možnost křížové reakce s hypofyzárním luteinizačním hormonem a právě tato vlastnost umožňuje vysokou citlivost. Je však důležité si uvědomit, že protilátka proti volné  $\beta$  podjednotce hCG reaguje jak s intaktním hCG, který je hlavní složkou těhotenského séra, tak i s fragmenty beta-podjednotky (beta-jádro), které jsou hlavní složkou v moči<sup>12</sup>.

Krev i moč ne gravidních žen obsahují malá množství hCG. Poprvé se hCG objevuje v mateřské krvi asi 6–8 dnů po oplodnění, přičemž jeho hladina rychle roste a dosáhne vrcholu po 7–10 týdnech. Většina současných těhotenských testů z moči může odhalit pozitivní výsledky 3–4 dny po oplodnění<sup>12</sup>.

Biochemická těhotenství jsou považována za poměrně častá, zahrnující až polovinu všech těhotenství, ale přesný počet je těžké určit, protože většina žen, které zažívají biochemické těhotenství, si nikdy neuvědomí, že jsou těhotné<sup>11</sup>.

### 1.2.2 Falešná gravidita

Falešná gravidita anebo *pseudocyesis* je stav, kde je žena, která není těhotná a nejeví známky psychózy pevně přesvědčena o tom, že je těhotná, a vyvíjí se jí objektivní známky těhotenství<sup>13</sup>.

Nejčastějším příznakem je vynechání nebo nepravidelnost menstruačního cyklu, obvykle po dobu devíti měsíců<sup>14</sup>. Objevuje se také abdominální zvětšení, ale bez vystoupení pupku. Změny ňader, které se vyskytují u 80 % pacientek, zahrnují také otoky a svědivost, sekreci mateřského mléka a areolární pigmentaci. Pacientky často pociťují pohyby plodu obvykle mnohem dříve než u pravé gravidity<sup>13</sup>. Může se také vyskytnout zvracení, ranní nevolnosti, absence apetitu a přírůstek hmotnosti<sup>14</sup>. Stanovení, zdali se jedná o *pseudocyesis*, anebo pravou graviditu, je v dnešní době jednoduché díky možnosti ultrazvukového vyšetření<sup>15</sup>.

Falešná gravidita může mít několik druhů podle příčiny jejího vzniku. Jedním podtypem *pseudocyesis* je také fingovaná gravidita. Jedná se o předstírání těhotenství za určitým specifickým účelem (např. získání pozornosti, získání dovolené v práci nebo dokonce vyhýbání se výkonu trestu). Fingováním gravidity si žena dokáže přivolat určité symptomy těhotenství<sup>16</sup>.

Dalším podtypem *pseudocyesis* je Couvadův syndrom také známý jako "Sympatické těhotenství". V tomto stavu osoba, která je velmi blízká k určité těhotné

ženě, může pociťovat těhotenství příbuzné fyzické symptomy. Zajímavostí je, že ve většině případů Couvadův syndrom zažívají mužští partneři těhotných žen<sup>17</sup>.

### 1.2.3 Spontánní potrat

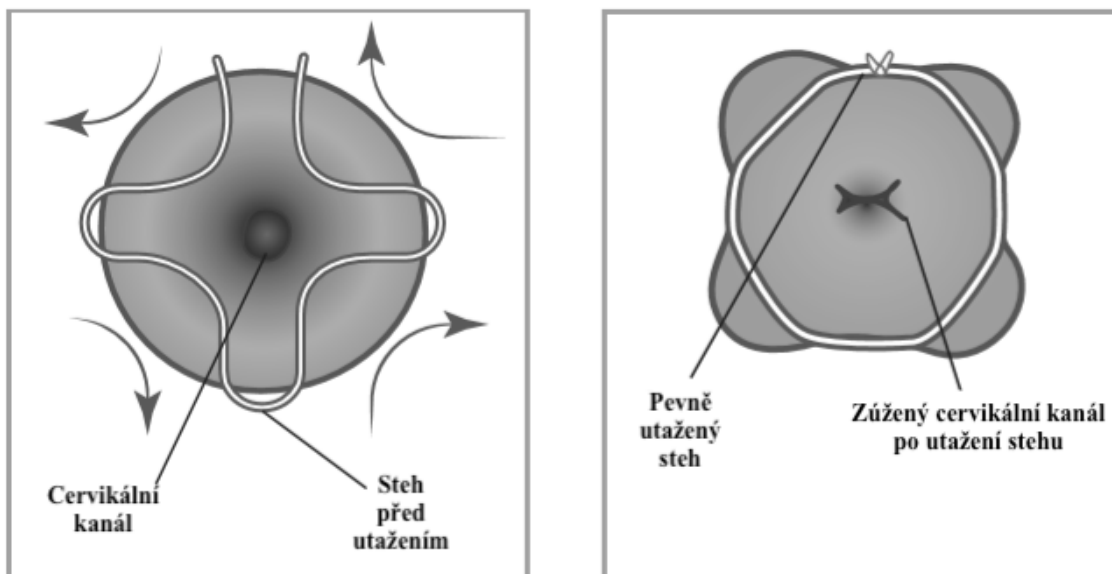
Spontánní potrat je definován různě, ale obvykle se definuje jako spontánní ukončení těhotenství, ke kterému dochází před 20. týdnem těhotenství úplným či neúplným vyloučením plodu z dělohy kvůli poruchám při vývoji embrya<sup>18</sup>.

Spontánní potrat způsobují především tyto příčiny<sup>19</sup>:

- Požívání alkoholu a drog
- Požívání tabákových výrobků
- Expozice toxickým látkám v okolním prostředí
- Poruchy hormonální regulace
- Infekce
- Nadváha
- Poruchy v činnosti reprodukčních orgánů ženy
- Problémy s imunitní odpovědí těla na plod
- Vážné chronické nemoci, jako například diabetes

Spontánní potrat se projevuje pánevní bolestí, krvácením a nakonec vyloučením plodu. Spontánní potrat v pozdějším týdnu těhotenství může začít odtečením plodové vody při prasknutí nitroděložní membrány. Krvácení je zřídka masivní. V takovém případě je děložní hrdlo dilatované<sup>20</sup>.

Potrátu lze zabránit tzv. cerkláží (z ang. Cerclage) děložního hrdla. Cervikální cerkláž je dobře známý chirurgický zákrok prováděný během těhotenství (Obr. 2). Zahrnuje umístění stehu kolem děložního hrdla s cílem poskytnout *cervixu* mechanickou oporu a tím snížit riziko předčasného porodu<sup>21</sup>.



**Obr. 2: Provedení cervikální cerkláže podle McDonalda:** Na pravé části obrázku je možné vidět umístění transvaginálního cervikálního stehu před utažením, tudíž na pravé části obrázku je cervikální kanál dilatovaný. Na levé části obrázku je možné vidět již utažený transvaginální cervikální steh, který zúží cervikální kanál. (upraveno dle <sup>22</sup>)

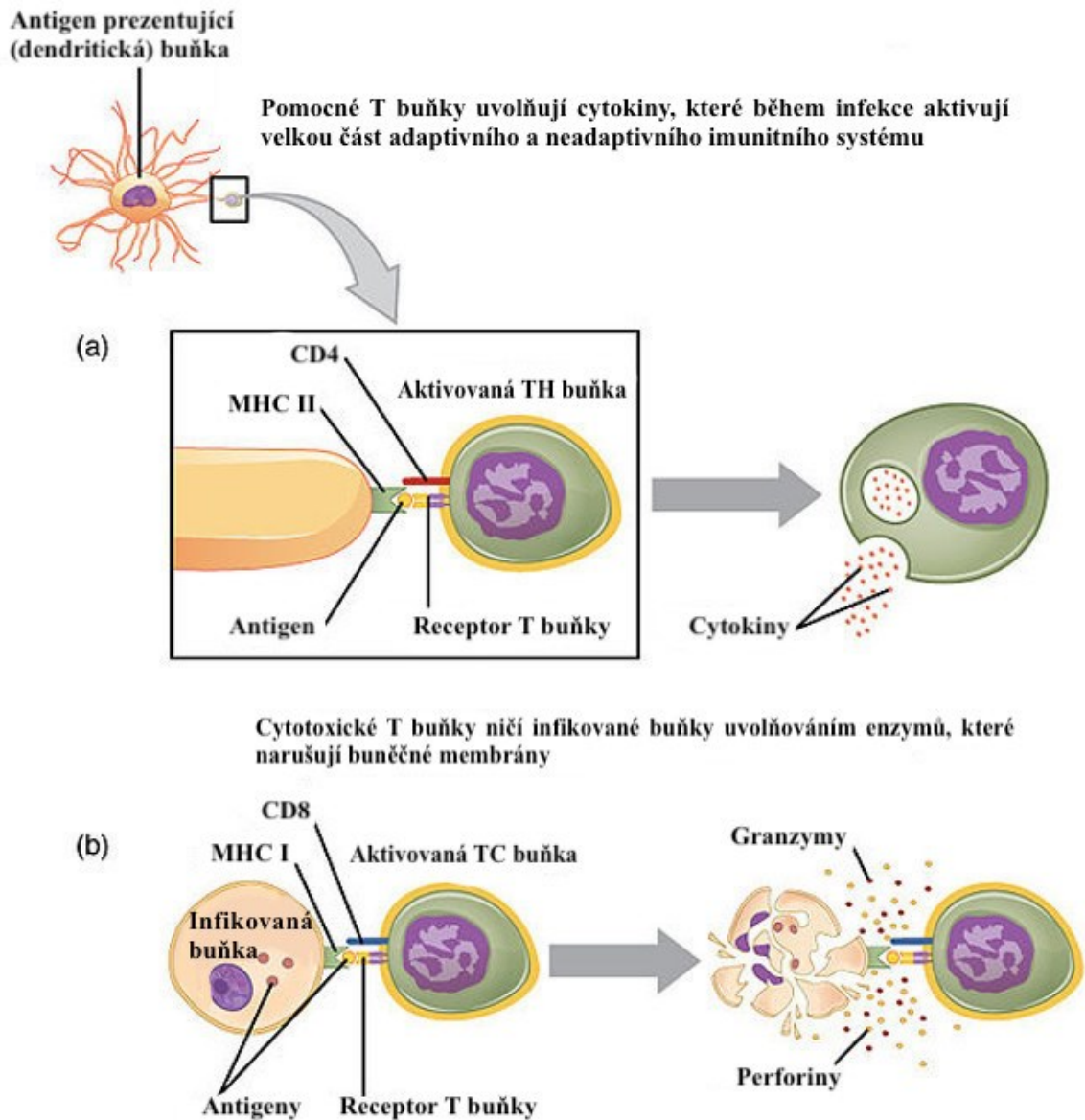
Pokud produkty početí zůstanou v děloze i po spontánním potratu, může dojít k vaginálnímu krvácení, někdy se zpožděním v hodinách až dnech. Může také vzniknout infekce, která způsobuje horečku, bolesti a v některých případech dokonce otravu krve<sup>20</sup>.

### 1.2.3.1 Imunitní reakce na plod

Důležitým předpokladem pro úspěšné těhotenství je to, že imunitní systém matky neodmítne plod. Proto by mohla být nezbytná regulace buněčné imunitní odpovědi spojené s TH1 buňkami. Za pomoci průtokové cytometrie je možné na buněčné úrovni ukázat, že jak CD4+, tak CD8+ T buňky z periferní krve produkují během normálního lidského těhotenství a krátce po porodu méně cytokinů TH1 (tj. IFN- $\gamma$  a IL-2) a více cytokinů TH2 (tj. IL-4). Poměr cytokinů TH1/TH2 v T buňkách žen během těhotenství a po porodu je výrazně nižší, než u žen, které zažili více spontánních potratů. Tyto ženy měly poměr TH1/TH2 zvýšený na téměř normální hodnotu, což naznačuje výrazný posun k TH1 imunitě<sup>23</sup>.

Expresí HLA-G molekul zvyšuje schopnost mononukleárních buněk produkovat IL-3, IL-1 $\beta$  a IL-10 a naopak snižuje syntézu prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$ . Interleukiny IL-3 a IL-1 $\beta$  stimulují růst placenty, zatímco TNF- $\alpha$  může vést k zániku plodu. Navíc molekuly HLA-G inhibují i cytolytickou schopnost specifických

TC-lymfocytů (Obr. 3) a buněčnou aktivitu T-lymfocytů vůči alogenním antigenům a působí na snížení produkce IFN- $\gamma$ <sup>24</sup>.



**Obr. 3: Aktivační a infekci potlačující funkce pomocných a cytotoxických T buněk:** Na základě interakce s antigen prezentujícími buňkami se CD4<sup>+</sup> T buňky diferencují na pomocné T buňky, které produkují cytokiny stimuluující jiné imunitní buňky, jako jsou žírné buňky a makrofágy (nejsou ukázány). Po aktivaci, CD8<sup>+</sup> cytotoxické T buňky uvolňují vezikuly obsahující enzymy jako jsou perforiny a granzymy, které ničí infikované buňky. (upraveno dle <sup>25</sup>)

Je předpokládáno, že přímý kontakt HLA-G molekul exprimovaných na trofoblastu s matčinými lymfocyty nebo makrofágy je nezbytný pro úspěšné udržení těhotenství<sup>24</sup>.

Na základě přítomnosti cytokinů v placentě dochází k výrazné převaze TH2 subpopulace lymfocytů nad TH1-lymfocyty. Tato převaha přispívá rovněž k úspěšnému

počátku těhotenství a jeho udržení, protože cytokiny, které jsou produkovány subpopulací TH1, jako jsou IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  a TNF- $\alpha$ , jsou považovány za embryotoxické. Na syntéze cytokinů udržujících převahu TH2-lymfocytů se podílejí buňky trofoblastu, buňky imunity a hormonální prostředí. Hladina cirkulujícího kortizolu v těhotenství stoupá, podobně i estrogen a progesteron<sup>24</sup>.

Steroidy potencují TH2 imunitní odpověď a inhibují sekreci prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 a INF- $\gamma$ . Estrogeny vedou ke stimulaci dozrávání B-lymfocytů s následnou tvorbou blokujících aloprotiláték. Progesteron působí na lymfocyty a indukuje v nich produkci IL-4 a IL-10. Naopak zase tyto cytokiny podněcují buňky trofoblastu k produkci hCG a tím nepřímou i k syntéze progesteronu. Choriový gonadotropin uvolňovaný trofoblastem brání apoptóze *corpus luteum*. Progesteron produkováný *corpus luteum* vede k převaze cytokinů, které podporují diferenciaci lymfocytů do subpopulace TH2. Vzniká tak vzájemný soulad a závislost mezi produkcí hormonů a funkčním stavem imunity nastaveným s ohledem na úspěšné udržení semialogenního plodu<sup>24</sup>.

#### 1.2.4 Zamklý potrat

Zamklý potrat je definován jako nezaznamenaná intrauterinní smrt embrya nebo plodu bez vyloučení produktů početí z dělohy. Zamklým potratem končí přibližně 15 % klinicky diagnostikovaných těhotenství<sup>26</sup>.

Starší literatura uvádí, že je chirurgická evakuace považována za standardní léčbu zamklých potratů<sup>27</sup>. Náklady na chirurgický zákrok a hospitalizaci, jakož i komplikace spojené s chirurgickým zákrokem a anestézií, jsou i dnes hlavním problémem. Kromě infekcí a krvácení může být snižená plodnost způsobená nitroděložními adhezemi, proto není chirurgický zákrok pro ženy, které ještě dítě nemají, přijatelnou volbou. Některé studie tak naznačily, že místo chirurgické evakuace může být vhodnější běžná lékařská péče<sup>28,29</sup>.

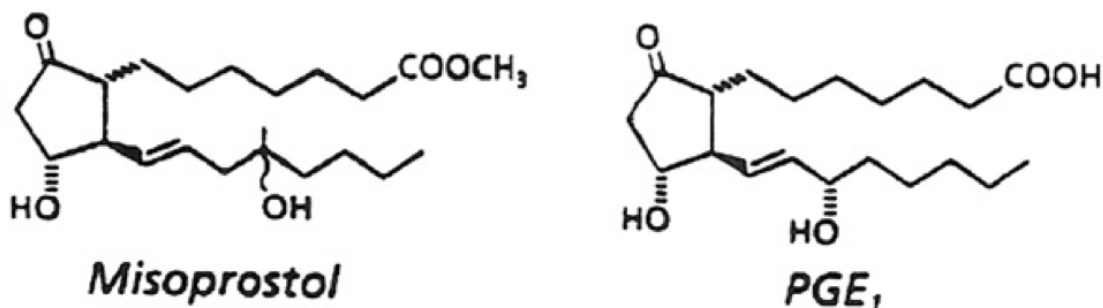
Řešením by mohla být léčiva založená na bázi misoprostolu, která byla rozsáhle studována za účelem vyloučení produktů početí z dělohy po zamklém potratu. Většina studií naznačuje, že větší dávka misoprostolu je účinnější než menší dávka a vaginální nebo sublinguální podání je účinnější než perorální podání<sup>30</sup>.

Největší randomizovaná kontrolní studie provedená ve Spojených státech prokázala úplné vyloučení produktů početí u 71 % žen, které měly zamklý potrat v



prvním trimestru, již 3. den po podání jedné dávky (800 µg) vaginálně podaného misoprostolu. Úspěšnost léčby byla zvýšena na 84 % po podání druhé dávky (800 µg, celkem 1,6 mg) vaginálně podaného misoprostolu<sup>31</sup>.

Misoprostol je syntetický analog prostaglandinu E1, který byl původně vyvinut za účelem prevence před žaludečními vředy u pacientů užívajících nesteroidní protizánětlivé léky<sup>32,33</sup>.



**Obr. 4: Chemická struktura misoprostolu (vlevo) a chemická struktura prostaglandinu E1 (vpravo):** Misoprostol se strukturálně liší od prostaglandinu E1: přítomností methylesteru na C1, přítomností methylové a hydroxylové skupiny na C16 ne na C15. Metylester na C1 zvyšuje antisekční účinnost a trvání působení misoprostolu. Pohyb hydroxylové skupiny z C15 na C16 a přidání methylové skupiny na C16 zlepšuje aktivitu léčiva po orálním užití, prodlužuje dobu působení a zlepšuje bezpečnostní profil léčiva. (*upraveno dle* <sup>34</sup>)

### 1.2.5 Indukovaný potrat

Indukovaný potrat neboli úmyslné ukončení těhotenství patří mezi nejčastější gynekologické postupy. Antropologové našli důkazy o uměle vyvolaných potratech v každé známé kultuře. V průběhu staletí byla uznána různá náboženská, sociální a politická nařízení, zákony a předpisy, které povolují nebo omezují potraty. Indukované potraty byly a jsou kontroverzní otázkou<sup>35</sup>.

V závislosti na potratových zákonech specifických pro danou zemi se liší míra restrikce indukovaných potratů, mohou být legální nebo přísně omezené. Bezpečný indukovaný potrat v souladu se zákonem je definován jako postup povolený zákonem a prováděný autorizovaným lékařem nebo odpovídajícím způsobem licencovaným lékařem na střední úrovni, jednajícím pod dohledem oprávněného lékaře s úmyslem ukončit těhotenství. Využití pojmu „bezpečný“ nebo „nebezpečný“ ve vztahu k indukovanému potratu je důležité, protože potrat v určitých oblastech světa nemusí vždy znamenat bezpečný potrat. Obecně platí, že pokud jsou zákony o indukovaném potratu vysoce restriktivní, přibývá potratů nebezpečných<sup>35</sup>.

Nebezpečný indukovaný potrat je tedy definován jako:

Procedura určená k ukončení nechtěného těhotenství, která je prováděna jednotlivci bez nezbytných dovedností, nebo v prostředí, které nespĺňuje minimální lékařské standardy<sup>35</sup>.

Nejběžnější procedurou je vakuová kyretáž v prvním trimestru. Před samotnou procedurou se musí zabezpečit bezbolestnost zákroku. Tlumení bolesti je často zabezpečeno paracervikálním blokem, kterému předchází podání nesteroidních analgetik a utlumení vnímání. Následně se dilatuje děložní hrdlo za pomoci konvenčních roztahovačů, hygroskopických roztahovačů anebo za pomoci misoprostolu. Dvanáct procent indukovaných potratů se provádí ve druhém trimestru a to většinou dilatací a evakuací (D&E). Před D&E se cervikální injekcí zavede vazopresin, který snižuje krvácení. Evakuace dělohy se provádí těžkými kleštěmi, které jsou rozšířeny o vakuové kanyly o průměru 14-16 mm<sup>36</sup>.

Jelikož v souvislosti s manuálním výkonem indukovaného potratu jsou spojeny komplikace, v dnešní době se indukovaný potrat častěji vykonává medicínální formou, při níž se o komplikacích zřídka hovoří. Indukovaný potrat v časných týdnech gravidity se vykonává za pomoci kombinací mifepristonu/misoprostolu a v pozdějších týdnech za pomoci dinoprostonu<sup>36</sup>.

### 1.2.5.1 Indukovaný potrat a legislativa České republiky

Ženy v České republice mohou práva na interrupci legálně využívat od roku 1958. Na žádost žen byl zákon o indukovaném potratu č. 68/1957 Sb. upraven z dřívějšího zákona č. 68/1950 Sb., jenž povoloval vedle spontánních potratů pouze interrupce ze zdravotních důvodů<sup>37</sup>.

Podle Českého statistického úřadu lze potratovost rozdělit na tyto období<sup>38</sup>:

**1. období (do roku 1958):** Zákon nepovoluje uměle vyvolaný potrat. Oficiální statistika pro toto období neexistuje. Odhaduje se, že indukované potraty byly prováděny pokoutně.

**2. období (1958 - počátek 70. let):** Zákon o umělém přerušení těhotenství (č. 68/1957 Sb.) zlegalizoval uměle vyvolaný potrat. Společnost uznala tento způsob ukončení těhotenství za mravně nezávadný. Spolu s tím, že spolehlivá antikoncepce

nebyla dostupná a omezování plodnosti bylo žádoucí, došlo k významnému rozšíření indukovaných potratů.

**3. období (první polovina 70. let):** Přijetí propopulačních opatření a zájem o rodinu se odrazil v poklesu počtu potratů. V roce 1974 se narodilo nejvíce dětí v historii ČR. Přesto bylo evidováno přes 78 tisíc potratů celkem a přibližně pětina těhotenství končila indukovaným potratem. Stimuly populační politiky nepůsobily dlouho. Do konce 70. let se potratovost vrátila na původní úroveň a navíc dále rostla.

**4. období (1987 - 2008):** Náhlý nárůst počtu potratů v roce 1987 byl způsoben přijetím vyhlášky, která zrušila interrupční komise. Rozhodnutí o umělém potratu zůstalo pouze na svobodné volbě ženy.

Na přelomu 80. a 90. let téměř polovina těhotenství byla ukončena potratem. Tento rapidní nárůst potratů byl pouze dočasným jevem. Vývoj potratovosti v první polovině 90. let byl ve znamení výrazného poklesu. Potratovost klesala až do roku 2006, kdy bylo dosaženo nejnižší úrovně potratovosti od konce padesátých let<sup>38</sup>.

V letech 2007-2008 se pokles zastavil a počet potratů začal stagnovat. V roce 2008 podstoupilo potrat 41446 žen. Vývoj umělé potratovosti v 90. letech byl ovlivněn zejména rozšířením antikoncepce. V roce 2008 užívala hormonální či nitroděložní antikoncepci více než polovina žen ve fertilním věku, zatímco na konci 80. let byl podíl žen užívajících tyto spolehlivé antikoncepční metody přibližně 20 %. Vývoj potratovosti v devadesátých letech dokazuje, že přímo úměrný vztah mezi potratovostí a plodností nemusí být pravidlem<sup>38</sup>.

V současné době se k potratům váží tyto právní normy: zákon č. 66/1986 Sb. o umělém přerušení těhotenství, vyhláška č. 75/1986 Sb. o umělém přerušení těhotenství a vyhláška č. 11/1988 Sb. o povinném hlášení ukončení těhotenství, úmrtí dítěte a úmrtí matky<sup>38</sup>.

Znění vybraných paragrafů zákona ČNR č. 66/1986 Sb. platného od 3. 11. 1986, v účinnosti od 1. 1. 1987 o umělém přerušení těhotenství<sup>39</sup>:

## **Účel zákona**

### **§1**

Zákon upravuje umělé přerušení těhotenství a se zřetelem na ochranu života a zdraví ženy a v zájmu plánovaného a odpovědného rodičovství stanoví podmínky pro jeho provádění.

## **Podmínky pro umělé přerušení těhotenství**

### **§4**

Ženě se uměle přeruší těhotenství, jestliže o to písemně požádá, nepřesahuje-li těhotenství dvanáct týdnů a nebrání-li tomu její zdravotní důvody.

### **§5**

Ženě lze uměle přerušit těhotenství ze zdravotních důvodů s jejím souhlasem nebo z jejího podnětu, jestliže je ohrožen její život nebo zdraví nebo zdravý vývoj plodu nebo jestliže jde o geneticky vadný vývoj plodu.

### **§6**

- (1) Ženě, která nedovršila šestnácti let, lze uměle přerušit těhotenství podle §4 se souhlasem zákonného zástupce, popřípadě toho, jemuž byla svěřena do výchovy.
- (2) Jestliže bylo podle §4 uměle přerušeno těhotenství ženě ve věku od šestnácti do osmnácti let, vyrozumí o tom zdravotnické zařízení jejího zákonného zástupce.

## **1.3 Problematika potratů v České republice a v zahraničí**

Problematika mezinárodního srovnání potratovosti je komplikována odlišnou právní úpravou v různých zemích. Zákroky, které jsou v České republice klasifikované jako “miniinterrupce”, jsou v zahraničí považovány za regulace menstruace. Zatímco v České republice je podmínkou pro takový zákrok (odsátí obsahu děložní dutiny krátce po vynechání menstruace) zjištění těhotenství, ve většině jiných zemí je regulace menstruace ambulantně prováděna, aniž by se zjišťovalo, jde-li o ženu těhotnou. Proto regulace menstruace nejsou ve většině zemí považovány za přerušení těhotenství, a to ani u těhotných žen. V České republice totožné zákroky jsou za přerušení těhotenství pokládány a jsou tak i statisticky sledovány. Proto při porovnávání počtu potratů a zejména umělých přerušení těhotenství je postavení České republiky zkresleno. Nelze

ovšem s jistotou předpokládat, že všechny země, které miniinterrupci nepokládají za přerušení těhotenství, zahrnují do svých statistik pouze interrupce provedené jinou technikou. Spíše je nutno respektovat, že legislativa potratů a umělých přerušení těhotenství, formovaná někde i místními politickými tlaky, je různorodá, a že proto definice potratu a interrupce v různých zemích se mohou odlišovat a statistiky lze proto porovnávat jen velmi opatrně<sup>40</sup>.

Potraty nebo umělá přerušení těhotenství nejsou však pravidelně sledovány všemi státními statistickými službami. Česká republika spolu se Slovenskem, Maďarskem a Rumunskem jsou v Evropě zeměmi, kde je statistika potratů nejuplněnější. Některé země (Švýcarsko, Belgie) statisticky potraty vůbec nesledují, protože je pokládají za přísně soukromou záležitost ženy, o níž není nikdo oprávněn vyžadovat informace. V Irské republice a od nedávna v Polsku jsou umělá přerušení těhotenství zákonem zakázána. Zatím co Irsko ve svých statistikách v kolonce “legální potraty” uvádí nulu, Polsko určitý velmi malý počet interrupcí (zcela výjimečně jsou tam povolovány) vykazuje. Velmi nízký počet umělých přerušení těhotenství vykazuje rovněž Rakousko. Již z uváděných čísel je zřejmé, že žádná z těchto zemí nevykazuje samovolné potraty, informují pouze o interrupcích – a pokud v některé zemi nejsou povoleny, potraty se v ní podle oficiálních statistik prostě vůbec nevyskytují<sup>40</sup>.

Nejnižší indikovaná potratovost, s výjimkou zemí, kde jsou interrupce zakázány nebo kde nejsou vykazovány, je v Nizozemsku. Postavení Nizozemska je paradoxem, protože je zde přístup k přerušení těhotenství naprosto liberální. Jejich nízký počet zřejmě plyne z všeobecného rozšíření kvalitní hormonální antikoncepce a pravděpodobně i z neúplného vykazování. S výjimkou Polska a Chorvatska je indikovaná potratovost v České republice nejnižší z postkomunistických zemí. Od roku 2000 je poprvé v historii nižší než na Slovensku. Pokud by za přerušení těhotenství nebyly považovány miniinterrupce, zařadila by se Česká republika mezi země s nejnižší indikovanou potratovostí vůbec. Od roku 1994 činí v České republice počet umělých přerušení těhotenství provedených tradičními technikami (bez miniinterrupce) méně než 10 na 100 narozených<sup>40</sup>.

Pro srovnání potratovosti v letech 1958 - 2014 viz Tab. 1 z dat ze CZSO<sup>40</sup>:

**Tab. 1: Ukončená těhotenství v minulosti podle způsobu:** Počet umělých přerušení těhotenství až do konce osmdesátých let 20. století v podstatě nepřímo koreloval s počtem narozených dětí. Klesl v polovině sedmdesátých let za vlny vysoké natality, na maximum vzrostl koncem osmdesátých let, kdy podíl těhotenství, ukončených interrupcí, přesáhl 40 % a počet umělých ukončení těhotenství se téměř vyrovnal s počtem narozených dětí. Ekonomická opatření, stimuluující porodnost v sedmdesátých letech, ztratila účinnost a míra využívání moderní antikoncepce, jež by bránila nechtěným otěhotněním, byla v této době relativně nízká. K vývojovému zlomu indikované potratovosti došlo v devadesátých letech 20. století. Podíl interrupcí z ukončených těhotenství začal výrazně klesat a od roku 2000 je nejnižší za celou dobu jejich statistického sledování. Úbytek umělých přerušení těhotenství proběhl v době, kdy se výrazně snižovala porodnost, interrupce však ubývaly rychleji než porodů. Někdejší situace, kdy se úbytek narozených přelával do přírůstku interrupcí, se neopakovala. (upraveno dle <sup>40</sup>)

Rok	Ukončená těhotenství	Narození	Potraty	Z toho indukované
1958	210 894	143 251	67 643	49 035
1959	209 579	130 310	79 269	61 914
1960	215 374	130 161	85 213	67 550
1961	219 563	132 201	87 362	70 062
1962	218 260	134 695	83 565	66 031
1963	221 739	150 062	71 677	51 470
1964	226 554	155 666	70 888	51 524
1965	224 886	148 545	76 341	58 554
1966	225 522	142 206	83 316	65 818
1967	226 144	139 413	86 731	69 850
1968	227 485	138 396	89 089	72 488
1969	235 243	144 155	91 088	74 263
1970	238 402	148 893	89 509	71 893
1971	241 685	155 233	86 452	68 652
1972	249 565	164 744	84 821	65 079
1973	259 939	182 953	76 986	55 898
1974	273 557	195 427	78 130	56 969
1975	269 211	192 869	76 342	55 511
1976	266 430	188 522	77 908	56 889
1977	264 521	182 865	81 656	61 114
1978	263 933	180 018	83 915	63 904
1979	256 708	173 084	83 624	64 505
1980	241 168	154 665	86 503	68 930
1981	234 559	145 186	89 373	71 574
1982	234 049	142 518	91 531	74 531
1983	230 165	138 132	92 033	75 037
1984	234 225	137 587	96 638	79 534
1985	235 845	136 488	99 357	83 042
1986	233 394	133 942	99 452	83 564
1987	258 159	131 469	126 690	109 626

**Tab. 1: (pokr.)**

Rok	Ukončená těhotenství	Narození	Potraty	Z toho indukované
1988	262 587	133 238	129 349	113 730
1989	255 388	128 881	126 507	111 683
1990	257 149	131 094	126 055	111 268
1991	249 900	129 850	120 050	106 042
1992	231 423	122 142	109 281	94 180
1993	206 915	121 470	85 445	70 634
1994	174 349	106 915	67 434	54 836
1995	157 987	96 397	61 590	49 531
1996	150 725	90 763	59 962	48 086
1997	147 903	90 930	56 973	45 022
1998	146 483	90 829	55 654	42 959
1999	141 877	89 774	52 103	39 382
2000	138 539	91 169	47 370	34 623
2001	136 035	90 978	45 057	32 528
2002	136 790	93 047	43 743	31 142
2003	136 261	93 957	42 304	29 298
2004	139 253	97 929	41 324	27 574
2005	142 521	102 498	40 023	26 453
2006	146 089	106 130	39 959	25 352
2007	155 864	114 947	40 917	25 414
2008	161 288	119 842	41 446	25 760
2009	159 195	118 667	40 528	24 636
2010	156 719	117 446	39 273	23 998
2011	147 854	108 990	38 864	24 055
2012	146 688	108 955	37 733	23 032
2013	144 804	107 117	37 687	22 714
2014	147 208	110 252	36 956	21 893

## 1.4 Možnosti diagnostiky a prevence potratů a jejich vývoj v čase

Novodobým standardem pro diagnostiku potratu je pánevní sonografie, která se doporučuje v případě krvácení nebo bolesti v prvním trimestru těhotenství. Sonografické vyšetření se doporučuje také v případě, že má lékař obavy o bezpečný průběh gravidity. Za pomoci této metody lze zjistit, zdali došlo k potratu, přičemž důkazem je přítomnost gestačního vaku (většího než 25 mm) bez embrya a s žloutkovým vakem nebo bez něj, jakožto i přítomnost gestačního vaku s embryem (větším než 7 mm) bez srdeční aktivity<sup>41</sup>.

V dnešní praxi se pro řešení a léčbu potratů v prvním trimestru využívají tyto tři postupy: lékařské ošetření, medicínální léčba nebo chirurgický zákrok. U asymptomatických žen se zpravidla medicínální léčba nepraktikuje, aby se tak předešlo případným nežádoucím komplikacím. V případě, kdy zůstanou produkty početí v děloze a samovolně se neodstraní, je lepší volbou operativní hysteroskopie<sup>41</sup>.

V případě, že žena opakovaně potráčí (tři a vícekrát), může být provedena přísná lékařská diagnostika abnormalit, které mohou být opraveny, aby se zabránilo dalšímu potrácení<sup>41</sup>.

#### **1.4.1 Screeningové testy v 1. trimestru a genetické poruchy**

Prenatální diagnostika je založená na komplexní spolupráci několika medicínských oborů – klinické genetiky, gynekologie a porodnictví, ultrazvukové diagnostiky a klinické biochemie. Vzhledem k náročnosti takovéto integrace je výhodné provádět prenatální diagnostiku v multidisciplinárních centrech s nepostradatelným zastoupením klinické genetiky. Může se zdát, že hlavním úkolem prenatální diagnostiky je včasné zachycení abnormalit ve vývoji plodu a nabídka umělého ukončení patologicky probíhajícího těhotenství. V návaznosti na klinicko-genetické poradenství je zde však úkolů více<sup>42</sup>:

1. Poskytnout párům s rizikem narození dítěte s vadou možnost informovaného výběru dalšího postupu.
2. Psychologicky podpořit rodiče, zvláště u případů závažných diagnóz či vysokých rizik.
3. Umožnit párům s konkrétním rizikem vrozené vady započít těhotenství s vědomím, že případné postižení plodu je diagnostikovatelné ještě před narozením.
4. Poskytnout párům v situaci před narozením postiženého dítěte optimální postup z hlediska těhotenské péče, vedení porodu a postnatální péče.
5. Umožnit případnou prenatální léčbu postiženého plodu. Ta je zatím k dispozici pouze pro velice malý počet vrozených vad a onemocnění. Například ultrazvukově diagnostikovaná významná infravezikální obstrukce močových cest, kde zavedení



trubičky do močových cest může zabránit nezvratnému poškození vyvíjejících se plic a ledvin.

Mezi genetikou a prenatálním vývojem lidského jedince existuje velmi složitý vztah, který má zásadní a praktické důsledky pro lidské zdraví a lidské nemoci. Pochopení normálních vývojových mechanismů a jejich genetické kontroly je nezbytné pro porozumění vzniku vrozených vývojových vad a geneticky podmíněných onemocnění. Pro úspěšné zavedení preventivních a terapeutických postupů je potom nezbytné co nejlepší porozumění patogenezi onemocnění na molekulárně-genetické úrovni. Jedinci s vrozenými chromozomálními aberacemi představují v současné době nadále závažný zdravotnický, sociální, etický, ale i ekonomický problém. Vrozené vady stále patří k významným příčinám perinatální, novorozenecké a kojenecké úmrtnosti<sup>42</sup>.

Chromozomální aberace představují odchylky karyotypu ve smyslu nestandardního počtu chromozomů (numerické aberace), či ve smyslu narušené struktury jednotlivých chromozomů (strukturální aberace). Tyto odchylky se mohou týkat jak nepohlavních (autozomální aberace), tak i pohlavních chromozomů (gonozomální aberace). Mezi klinicky definovanými syndromy způsobenými autozomálními aberacemi převažují trizomie – Downův syndrom (trizomie 21. chromozomu), Edwardsův syndrom (trizomie 18. chromozomu) a Patauův syndrom (trizomie 13. chromozomu). V případě syndromů způsobených gonozomálními aberacemi jde převážně o znásobení počtu gonozomů – syndrom Klinefelterův (47, XXY), syndrom 47, XXX či 47, XYY, případně o monozomii – Turnerův syndrom (45, X). Klinická praxe je složitější, kdy se pod příslušnými klinickými diagnózami mohou skrývat mozaikové karyotypy, parciální duplikace či delece nebo jiné strukturální abnormality zodpovědných chromozomů<sup>42</sup>.

Cílem primárního screeningu je identifikace těhotenství s vyšším rizikem vrozené vady a poskytnutí cílené prenatální diagnostiky. Screeningová vyšetření sice nedokážou určit, zdali je plod skutečně postižen, ale pomohou zúžit okruh těhotných se zvýšeným rizikem. V současné době neexistuje žádný univerzální screeningový test, který by byl schopen odhalit všechny druhy možného poškození plodu. Z tohoto důvodu v praxi využíváme v prenatální péči různé screeningové strategie, které se navzájem doplňují. Indikací ke stanovení karyotypu mohou být<sup>42</sup>:

**a)** věk matky, anamnestické údaje z rodinné anamnézy, nález balancované chromozomální aberace

**b)** pozitivita kombinovaného testu v I. trimestru (stanovení rizika chromozomální aberace na základě kombinace věku matky, hladin volné  $\beta$  podjednotky hCG a PAPP-A a hodnoty tzv. šíjového ztluštění u plodu v 11.–13. týdnu těhotenství)

**c)** pozitivita biochemického screeningu ve II. trimestru (alfafetoprotein, choriový gonadotropin, estriol)

**d)** přítomnost ultrazvukových markerů chromozomálních aberací při ultrazvukovém vyšetření ve II. trimestru.

Pro diagnózu chromozomálních aberací je standardem cytogenetické vyšetření, tj. vyšetření karyotypu. Pro získání materiálu k vyšetření se v rámci prenatalní diagnostiky pořád uplatňují klasické invazivní metody – amniocentéza, odběr choriových klků a kordocentéza. V postnatální diagnostice se v drtivé většině případů jedná o odběr periferní krve. Mimo standardní cytogenetické analýzy se využívají i metody molekulárně cytogenetické. Stále větší uplatnění v prenatalní diagnostice chromozomálních aberací nachází tzv. rychlá diagnostika pomocí metody kvantitativní fluorescenční PCR (QF-PCR), byť v určitých oblastech (zejména v diagnostice strukturálních abnormalit) zatím nemůže klasické vyšetření karyotypu nahradit<sup>42</sup>.

## **1.5 Biochemické markery**

Biochemický marker je definován jako, jakákoli sloučenina (např. antigen, protilátka, abnormální enzym nebo hormon), které hladina je v nemoci značně změněna. Tato látka slouží jako objektivní nástroj při diagnostice nebo předpovídání náchylnosti k určité patologii<sup>43</sup>.

### **1.5.1 Annexin V a jeho rodina**

Annexiny jsou skupinou proteinů, které se v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{K}^+$  vážou na kyselé fosfolipidy (biologické membrány)<sup>44</sup>. Každý annexin, kromě ANXA6 který se skládá ze dvou struktur přepojených krátkým peptidovým řetzcem, obsahuje jádro složené ze čtyř domén složených ze 70 aminokyselin<sup>45</sup>.

Interakce těchto proteinů s biologickými membránami vedla k domněnce, že tyto proteiny mohou hrát roli při procesech spojených s membránovým přenosem, jako je exocytóza, endocytóza a adheze dvou buněk<sup>44</sup>.

### **Annexin I:**

Annexin 1 (ANXA1) je prvním charakterizovaným členem annexinů. ANXA1 může být indukován podobně jako glukokortikoidy v zánětlivých buňkách a sdílí s těmito léky mnoho protizánětlivých účinků. ANXA1, původně popsán jako inhibiční protein fosfolipasy A2 (PLA2), může kromě metabolismu kyseliny arachidonové ovlivnit mnoho jiných složek zánětlivé reakce<sup>46</sup>.

Nedávná studie ukázala, že ANXA1 může specificky účinkovat na cytosolický PLA2 přímou inhibicí enzymu. Také inhibuje expresi a aktivitu jiných zánětlivých enzymů, jako je např. syntasa oxidu dusnatého v makrofázích a cyklooxygenasa v aktivovaných mikroglíích. Inhibice exprese NOS je pravděpodobně způsobena ANXA1 indukovanou produkcí IL-10 v makrofázích<sup>46</sup>.

Stejně jako glukokortikoidy má ANXA1 výrazné inhibiční účinky na migraci neutrofilů a monocytů při zánětu. K inhibičnímu účinku na buněčnou migraci může přispět aktivace receptorů, jako je formylpeptidový receptor a lipoxinový receptor. Annexin I byl identifikován jako jeden ze signálů „eat-me“ na buňkách v procesu apoptózy, které mají být rozpoznávány fagocyty, protože bylo zjištěno, že podporuje zánětlivou buněčnou apoptózu spojenou se zvýšením hladiny intracelulárního vápníku<sup>46</sup>.

### **Annexin II:**

Annexin II (ANXA2) může existovat jako monomer, heterodimer nebo heterotetramer. Schopnost tetrameru annexinu II přemostovat sekreční granule a plazmatickou membránu naznačuje, že tento protein může hrát roli v Ca<sup>2+</sup> dependentní exocytóze, také byl prokázán na extracelulární úrovni některých metastatických buněk, kde zprostředkovává vazbu určitých metastatických buněk na normální buňky. Tetramer annexinu II je hlavním buněčným substrátem proteinové kinasy C a transformačního virálního proteinu Rousova sarkomu (pp60src). Transformační protein pp60src je fosfoprotein s enzymatickou schopností fosforylovat tyrosin v proteinovém substrátu annexinu II<sup>44</sup>.

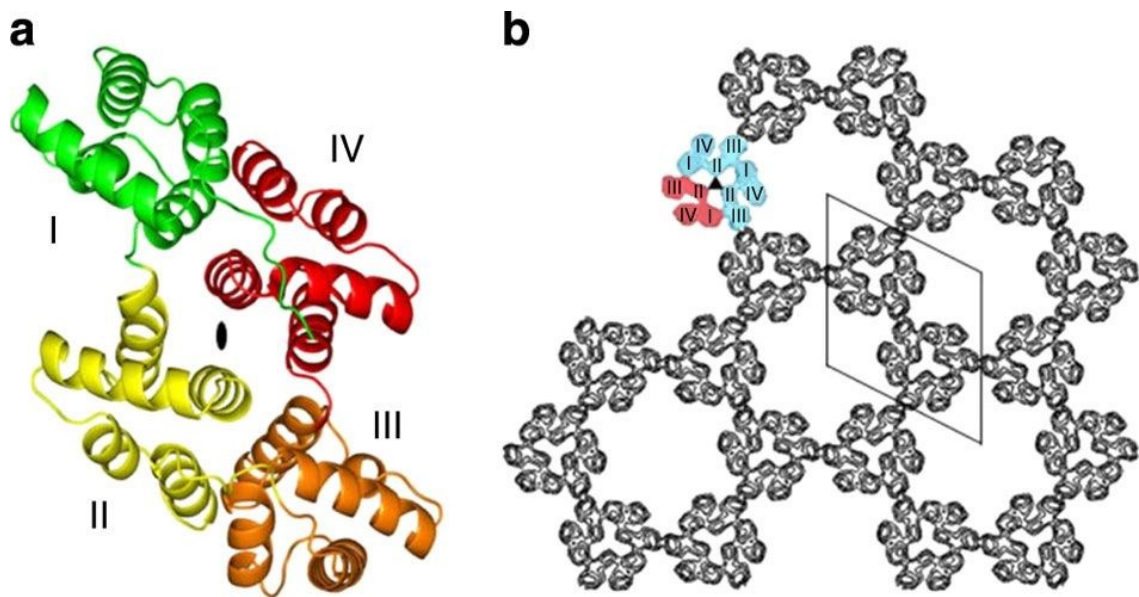
## **Annexin V:**

Annexin V patří mezi annexiny, které jsou přítomny extracelulárně i intracelulárně. V devadesátých letech 20. století byl annexin A5 zkoumán jako molekulární zobrazovací činidlo pro vizualizaci buněk exprimujících fosfatidylserin v procesu apoptózy na zvířecích modelech a také na lidech<sup>47</sup>.

Annexin V je protein o velikosti 35,7 kDa, který se reverzibilně váže na membrány nesoucí fosfatidylserin<sup>48</sup>. Terciární struktura rozpustné formy annexinu V byla zjištěna rentgenovou krystalografií<sup>49</sup>. Rentgenová krystalografie odhalila, že se terciární struktura annexinu V skládá ze čtyř domén, které jsou cyklicky uspořádány. Toto uspořádání udává molekule annexinu V mírně zakřivený, konkávní tvar. Vazebná místa pro vápenaté ionty a fosfatidylserin jsou umístěna na konvexní straně proteinu směřující k membráně<sup>50</sup>.

Na základě fluorescenčních měření bylo zjištěno, že annexin V mění konformaci, když se naváže tryptofanový zbytek lokalizovaný na jeho čtvrté doméně na membránový fosfatidylserin<sup>51</sup>. Data získaná elektronovou krystalografií však ukázala, že membránově vázaná forma monomeru annexinu V má téměř stejnou strukturu jako jeho rozpustná forma<sup>52</sup>. To znamená, že forma vázaná na membránu má konvexní tvar na straně obsahující fosfolipidová vazebná místa. To také ukazuje, že různé domény molekuly annexinu V mají nerovnoměrnou vzdálenost od povrchu membrány za předpokladu, že povrch membrány není ohnutý. Jak elektronová krystalografie, tak atomová mikroskopie naznačují, že doména III je nejvzdálenější od povrchu membrány a doména II je nejbližší<sup>52,53</sup>.

Elektronová krystalografie membránově vázaného annexinu V prokázala, že molekuly annexinu V se mohou navzájem asociovat prostřednictvím interakcí protein-protein<sup>54</sup>. V roztoku jsou molekuly annexinu V ve formě monomeru, ale po navázání na membránu exprimující fosfatidylserin se samy sestaví do trimerů, po čemž následuje tvorba dvourozměrné krystalové mřížky (Obr. 5 - b).



**Obr. 5: Třírozměrná struktura annexinu V (a) a dvourozměrná struktura krystalové mřížky složené z jednotek annexinu V (b): (a) Pohled na molekulu annexinu V z konkávní strany molekuly. Annexin V je tvořen čtyřmi  $\alpha$ -helikálními doménami, číslovanými I-IV, které tvoří konzervované jádro. Molekula je pozorována podél tzv. dvojí osy symetrie (tmavá elipsa), která se vztahuje k modulu (I + IV) a k modulu (II + III)<sup>49</sup>. (b) Pohled na dvourozměrnou krystalovou strukturu membránově vázaného annexinu V. Při vazbě na membránu se molekuly annexinu V samy sestavují do trimerů a 2D krystalů trimerů s různými uspořádáními<sup>55,56,57</sup>. Tato část obrázku představuje hlavní 2D krystalické uspořádání tvořené trimery annexinu V. Trimer annexinu V je zobrazen s jedním červeným a dvěma modrými monomery. (upraveno dle<sup>58</sup>)**

### **Role annexinu V na povrchu buněk v procesu apoptózy:**

Správné (fyziologické) uspořádání buněčné membrány je značně asymetrické, což se značně mění když buňka vykonává apoptózu. Tento apoptický stav je možné detekovat za pomoci molekul silně a specificky interagujících s fosfatidylserinem. V procesu apoptózy je fosfatidylserin exprimovaný na vnější straně membrány a je možné ho detekovat za pomoci fluorescenčně značeného annexinu V<sup>59</sup>.

Fosfatidylserin exprimovaný na povrchu buněk v procesu apoptózy slouží jako signál „eat me“ jak pro fagocyty, tak i pro makrofágy<sup>60</sup>. Fosfatidylserin na apoptických buňkách má také důležitou roli při potlačování autoimunitní odpovědi proti autoantigenům fagocytované umírající buňky<sup>61</sup>. Imunoregulační aktivita fosfatidylserinu pravděpodobně vyplývá z jeho schopnosti modulovat produkci fagocytárních cytokinů<sup>62</sup>. Fosfatidylserin spouští fagocytózu prostřednictvím přímé aktivace fosfatidylserinových receptorů na makrofágu nebo prostřednictvím můstkových molekul, např. laktadherin, beta-2-glykoprotein 1 a annexiny I a II<sup>63,64</sup>.

Také bylo zjištěno, že annexin V inhibuje fagocytózu umírajících buněk<sup>65</sup>. Kromě inhibice fagocytózy buňky v procesu apoptózy bylo také popsáno, že vazba annexinu V na povrch buňky ovlivňuje také proces její smrti<sup>66</sup>.

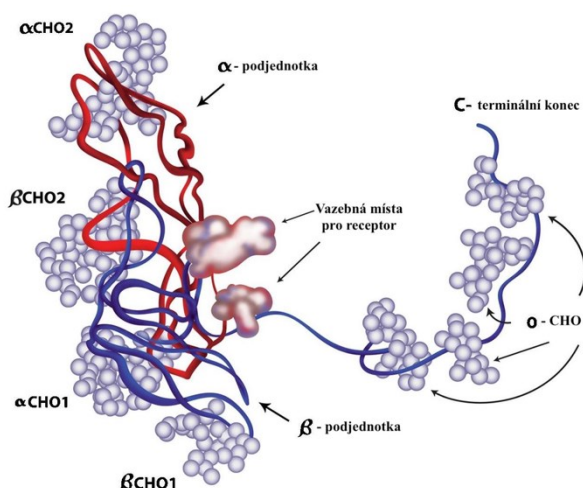
### 1.5.2 PAPP-A

Pappalysin-1, jinak známý jako PAPP-A, je klíčovým regulátorem biologické dostupnosti inzulínu podobného růstového faktoru, který je nezbytný pro normální vývoj plodu. V mateřské krvi se během těhotenství hladina tohoto proteinu zvyšuje a po porodu rychle klesá. V klinické praxi se PAPP-A rutinně používá pro screening Downova syndromu v prvním trimestru těhotenství, protože jeho pokles ve srovnání s fyziologickým těhotenstvím naznačuje zvýšené riziko jak chromozomálních anomálií, tak i jiných patologií<sup>67</sup>.

### 1.5.3 hCG a volná $\beta$ podjednotka hCG

Lidský choriový gonadotropin je hormon produkováný primárně syncytiotrofoblastickými buňkami placenty během těhotenství. HCG stimuluje *corpus luteum*, aby produkoval progesteron k udržení těhotenství. Menší množství hCG se také produkuje v hypofýze, játrech a tlustém střevě<sup>68</sup>.

Samotný hCG je glykoprotein složený z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky (Obr. 6)<sup>68</sup>. Během těhotenství se v krevním séru a moči vyskytuje více forem, včetně intaktního hormonu.



Lidský choriový gonadotropin je primárně katabolizován játry a ledvinami. Celkem 20 % hCG je vylučováno močí.

Volná  $\beta$  podjednotka hCG je degradována v ledvinách za vzniku fragmentu, který je měřen testy na přítomnost hCG v moči<sup>69</sup>.

**Obr. 6: Glykosylovaný lidský choriový gonadotropin (hCG).** Na obrázku je možné vidět  $\alpha$  (červená) a  $\beta$  podjednotku (modrá) hCG. (upraveno dle<sup>70</sup>)

### **Testy hCG z krevního séra:**

Testy na přítomnost hCG v krevním séru využívají dvě protilátky, jednu fixovanou a druhou radioaktivně značenou. Tyto protilátky se vážou na různá místa v molekule hCG a tím ji imobilizují. Takto imobilizovanou molekulu hCG je možné detekovat<sup>71</sup>. Testy na přítomnost hCG v krevním séru zahrnují vymytí nadbytečných složek séra a měření množství zbývajícího radioaktivně značeného hCG<sup>69</sup>.

### **Testy hCG z moči:**

Močové testy se provádějí podobně jako sérové, ačkoliv jsou méně citlivé<sup>72</sup>. Množství testů na přítomnost hCG v moči nedetekuje hyperglykosylovaný hCG, který je v časném těhotenství nejpočetnější formou, což má za následek velké rozdíly v citlivosti mezi testy z krevního séra a testy z moči<sup>69</sup>.

## **1.6 Vliv toxoplazmózy na průběh gravidity**

*Toxoplasma gondii* je parazit, kterým je nakažena až třetina světové populace. Tímto parazitem je možné se nakazit hlavně požitím potravy nebo vody, která je kontaminována oocystami (roznášejí je kočky), nebo konzumací nedostatečně tepelně upraveného nebo syrového masa obsahujícího tkáňové cysty. Primárně je infekce tímto parazitem subklinická, ale u některých pacientů se může objevit cervikální lymfadenopatie nebo onemocnění očí. U pacientů s oslabenou imunitou může reaktivace latentního onemocnění způsobit život ohrožující encefalitidu. Infekce toxoplazmózou během těhotenství může způsobit vážné poškození plodu<sup>73</sup>.

Toxoplazmóza může být diagnostikována přímou detekcí parazita nebo sérologickými technikami. Nejčastěji používaným a pravděpodobně i nejúčinnějším terapeutickým postupem je využití kombinace pyrimethaminu se sulfadiazinem a kyselinou folinovou<sup>73</sup>.

### **Průběh infekce *Toxoplasma gondii*:**

Po vstupu parazita do organismu jsou vnější stěny oocyst narušeny enzymatickou degradací a neúčinné fáze (bradyzoity a sporozity) jsou uvolněny do střevního lumenu. Rychle napadají a množí se v okolních buňkách, kde se stanou tachyzoity. Další šíření parazita je následováno jeho uvolněním z narušených buněk, s následnou invazí

sousedících buněk a krve. Protože toxoplazmóza může infikovat prakticky všechny buňky a tkáně, je její šíření značně rychlé<sup>74</sup>.

V této parazitické fázi dochází k nakažení placenty, přičemž po určité době může dojít k nakažení samotného plodu. Čas mezi počáteční placentární a skutečnou fetální nákazou závisí na několika faktorech, jako je velikost inokula, virulence kmene toxoplazmózy a vývojová fáze placenty. Optimální podmínky pro přenos na placentu zahrnují nástup parazitémie před rozvojem humorální nebo buněčné imunity u matky a dobře rozvinutý placentární krevní tok, jaký je přítomen v druhé části těhotenství<sup>74</sup>.

Je-li nákaza *Toxoplasma gondii* získána před 10. týdnem gravidity, přenos parazita na plod je méně častý a pokud je toxoplazmóza získána před početím, přenos na plod je vzácný. Výskyt fetální infekce souvisí se stádiem těhotenství, v kterém těhotná žena infekci získá. Bez léčby, je incidence 10-15 % pro získání během prvního trimestru, 30 % pro druhý trimestr a 60 % pro třetí trimestr<sup>74</sup>.



## **2 Cíle práce**

Cílem této bakalářské práce bylo podat přehled informací z literatury, vztahujících se k problematice potratovosti se zvláštním zřetelem ke spontánním potratům. Cílem experimentální části práce je ověřit, nakolik je annexin V vhodným biochemickým markerem pro časné stanovení a prevenci potratů.

## **3 Materiál a metody**

### **3.1 Použitý materiál a pomůcky**

#### **Chemikálie:**

- Standardní kalibrační roztoky:
  - 6,25 U/ml
  - 12,5 U/ml
  - 25,0 U/ml
  - 50,0 U/ml
  - 100,0 U/ml
- Pozitivní kontrola
- Negativní kontrola
- Roztok konjugátu proti lidskému IgG, IgA a IgM o objemu 15,0 ml
- Roztok substrátu (1,2 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin a 3,0 mM peroxid vodíku)
- Zředovací fosfátový pufr
- Terminační roztok (0,5 M kyselina sírová)
- Promývací roztok (TRIS pufr)
- Destilovaná voda

#### **Přístroje a pomůcky:**

- Centrifuga MPW - 310
- ELISA čtečka Metertech M960
- Pipety značky Eppendorf Research Plus
- Evakuované zkumavky na srážlivou krev
- Zkumavky podle Eppendorfa o objemu 1,5 ml
- Kádinky
- Mikrotitrační destička s foliovým překrytím

### **3.2 Příprava krevního séra pro analýzu**

- a) Byla odebrána krev intravenózně z periferní krve do evakuovaných zkumavek
- b) Krev byla ponechána delší dobu (~ 4 hod.) za laboratorní teploty pro oddělení erythrocytů a krevního séra
- c) Po sedimentaci byly zkumavky s krví centrifugovány 10 min. na stolní centrifuze MPW - 310 s výkyvným rotorem při 1300 RPM.
- d) Po centrifugaci byl supernatant (tj. leukocytární sérum) rozaliquotován do mikrozkušavek po objemu 400,0  $\mu$ l.
- e) Alikvoty byly označeny a uskladněny pro vlastní analýzu hlubokým zmražením v - 80 °C.

### **3.3 ELISA testy krevních sér pro stanovení annexinu V**

- a) Vzorky krevních sér byly před analýzou ponechány za laboratorní teploty, aby se vytemperovaly na teplotu 25 °C.
- b) Během temperování krevních sér byla zapnuta ELISA čtečka Metertech M960 aby se vytemperoval. Byl na něm předpřipraven program pro měření sér, aby se zkrátila doba mezi terminací reakce a samotnou analýzou.
- c) Fosfátový pufr (zředovací roztok) byl před použitím 20x zředěn destilovanou vodou.
- d) Vzorky byly zředěny fosfátovým pufrem, a to přidáním 1,0 ml roztoku pufru do 10,0  $\mu$ l krevního séra.
- e) Do každé z jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100,0  $\mu$ l zředěného krevního séra.
- f) Do prvních dvou sloupců mikrotitrační destičky byly v duplikátech pipetovány kalibrační roztoky, pozitivní kontrola a negativní kontrola. Objem pipetovaných složek činil též 100,0  $\mu$ l.
- g) Mikrotitrační destička byla poté překryta adhezivní folií a byla inkubována 60 min. za laboratorní teploty.
- h) Po inkubaci byly roztoky z destičky vylity a destička byla osušena jemným poklepáním po plátku buničiny.
- i) Jamky mikrotitrační destičky byly promyty třikrát 300,0  $\mu$ l promývacího pufru a následně byla destička osušena stejně jako v kroku h).
- j) Do každé jamky bylo pipetováno 100,0  $\mu$ l roztoku konjugátu, destička byla překryta adhezivní folií a byla inkubována 30 min. za laboratorní teploty.

- k) Po inkubaci byla destička promyta stejně jako v kroku i)
- l) Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100,0  $\mu$ l roztoku substrátu, byla překryta adhezivní folií a byla inkubována 10 min. za laboratorní teploty. Přidání roztoku substrátu do jamek bylo doprovázeno vznikem modrého zbarvení.
- m) Po inkubaci bylo do jamek pipetováno 100,0  $\mu$ l terminačního roztoku. Ukončení reakce bylo doprovázeno změnou barvy z modré na žlutou.
- n) Okamžitě po terminaci byla na ELISA čtečce změřena absorbance při 450 nm. ELISA čtečka automaticky na základě kalibrace přepočítala absorbance na koncentrace annexinu V.

### 3.3.1 Charakteristika výběrového souboru

Získaná data byla naměřena ze vzorků krevních sér pacientek vybraných na základě následujících kritérií:

- všechny pacientky byly v čase odebrání vzorku v prvním trimestru gravidity
- pacientky z kontrolního souboru normálně porodily zdravého dítě
- pacientky ze souboru reprezentujícího patologii prodělaly spontánní potrat

Pacientkám v kontrolním souboru byly odebrány a zpracovány vzorky krve v rozmezí od 7. do 10. týdnu gravidity. Týden ukončení gravidity porodem zdravého dítěte u žen v kontrolní skupině byl v rozmezí od 36. do 40.

Pacientkám v souboru reprezentujícím patologii byly odebrány a zpracovány vzorky krve v rozmezí od 7. do 10. týdne gravidity.

### 3.4 Statistické zpracování dat

*Statistické zpracování dat zahrnovalo výpočet:*

- a) Aritmetického průměru hodnot kontrolní skupiny podle vzorce:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

kde:  $\bar{x}$  ... aritmetický průměr hodnot kontrolní skupiny [U/ml],  $x_i$  ... hodnota koncentrace annexinu V i-té složky kontrolního souboru [U/ml],  $n$  ... počet pacientek v daném souboru.

b) Aritmetického průměru hodnot patologické skupiny podle vzorce:

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y_i}{n} \quad (2)$$

kde:  $\bar{y}$  ... aritmetický průměr hodnot patologické skupiny [U/ml],  $y_i$  ... hodnota koncentrace annexinu V i-té složky patologického souboru [U/ml],  $n$  ... počet pacientek v daném souboru.

c) Směrodatné odchytky kontrolní skupiny podle vzorce:

$$S_x = \pm \sqrt{\frac{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (3)$$

kde:  $S_x$  ... směrodatná odchytky [U/ml],  $\bar{x}$  ... aritmetický průměr hodnot kontrolní skupiny [U/ml],  $x_i$  ... hodnota koncentrace annexinu V i-té složky kontrolního souboru [U/ml],  $n$  ... počet pacientek v daném souboru.

d) Směrodatné odchytky patologické skupiny podle vzorce:

$$S_y = \pm \sqrt{\frac{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (4)$$

kde:  $S_y$  ... směrodatná odchytky [U/ml],  $\bar{y}$  ... aritmetický průměr hodnot patologické skupiny [U/ml],  $y_i$  ... hodnota koncentrace annexinu V i-té složky patologického souboru [U/ml],  $n$  ... počet pacientek v daném souboru.

e) Hodnoty směrodatné odchytky průměru kontrolní skupiny podle vzorce:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S_x}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

kde:  $S_{\bar{x}}$  ... směrodatná odchytky průměru [U/ml],  $S_x$  ... směrodatná odchytky [U/ml],  $n$  ... počet pacientek v daném souboru

f) Hodnoty směrodatné odchytky průměru patologické skupiny podle vzorce:

$$S_{\bar{y}} = \frac{S_y}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

kde:  $S_{\bar{y}}$  ... směrodatná odchytky průměru [U/ml],  $S_y$  ... směrodatná odchytky [U/ml],  $n$  ... počet pacientek v daném souboru

g) Hodnoty Studentova t-testu podle vzorce:

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{S_{\bar{x}}^2 + S_{\bar{y}}^2 - 2I_{xy} S_{\bar{x}} S_{\bar{y}}}} \quad (7)$$

kde:  $t$  ... hodnota Studentova testu,  $S_{\bar{x}}$  ... směrodatná odchytky průměru [U/ml],  $\bar{x}$  ... aritmetický průměr hodnot kontrolní skupiny [U/ml],  $S_{\bar{y}}$  ... směrodatná odchytky průměru [U/ml],  $\bar{y}$  ... aritmetický průměr hodnot patologické skupiny [U/ml],  $y_i$  ... hodnota koncentrace annexinu V i-té složky patologického souboru [U/ml],  $n$  ... počet pacientek v daném souboru,  $I_{xy}$  ... index korelace.

Tabelovaná kritická hodnota Studentova t-testu<sup>75</sup> pro hladinu významnosti  $\alpha = 0,20$  a 21 stupňů volnosti činí  $t_{krit} = 1,32$ .

## 4 Výsledky

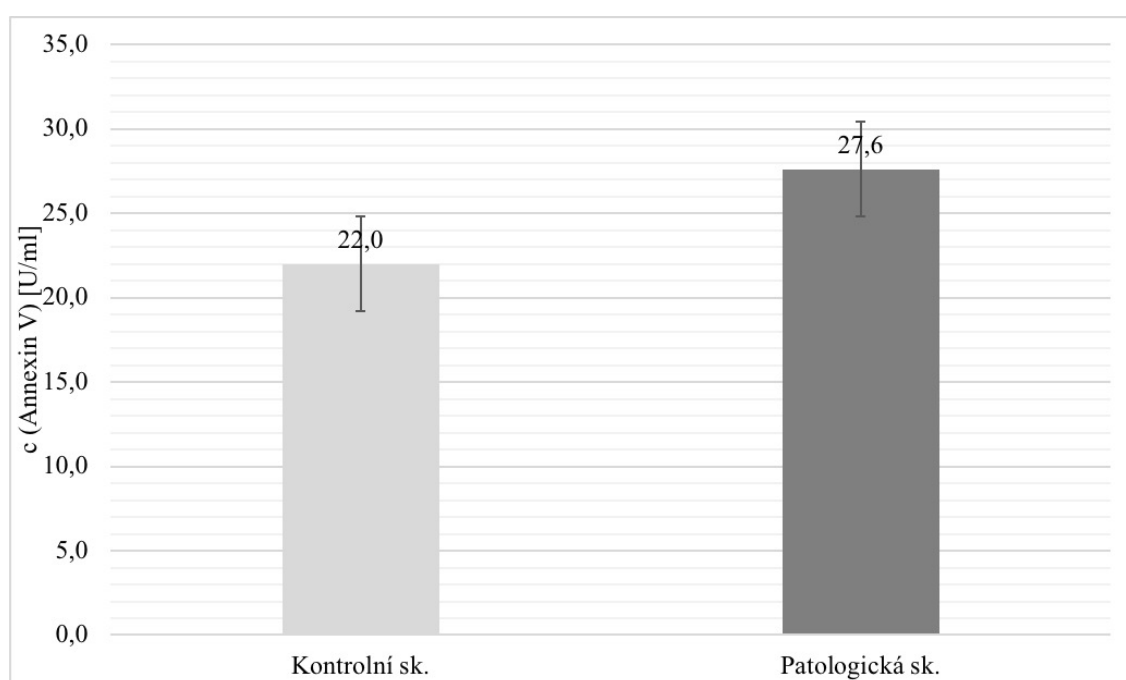
Připravená krevní séra (kapitola 3.2; na str. 35) byla podrobena analýze ELISA (kapitola 3.3; na str. 35-36). Při analýze krevních sér byla nejdříve změřena jejich absorbance při 450 nm. Hodnoty absorbancí ELISA čtečka přepočítala na koncentrace za pomoci kalibračních roztoků (kapitola 3.1; na str. 34). Naměřené hodnoty koncentrace annexinu V kontrolní (Tab. 2) a patologické skupiny (Tab. 3) jsou uvedeny v tabulkách. V každé zkoumané skupině byl vypočítaný aritmetický průměr naměřených hodnot annexinu V, který činil 22,0 U/ml v kontrolní a 27,6 U/ml v patologické skupině. Pro grafické znázornění rozdílu aritmetických průměrů hodnot v jednotlivých skupinách viz Obr. 7. Naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány (kapitola 3.4; na str. 36-38). Statistickým zpracováním dat (Tab. 4) byla zjištěna nerovnost:  $t = 1,51 > t_{krit} = 1,32$ . Na základě této nerovnosti můžeme zamítnout nulovou hypotézu  $H_0$  a rozdíl mezi aritmetickými průměry kontrolní a patologické skupiny je významný na hladině významnosti  $\alpha = 0,20$ . Tudíž můžeme tvrdit, že annexin V je v prvním trimestru vhodným markerem pro časnou detekci a prevenci potratů, a to s 80 % spolehlivostí.

**Tab. 2: Tabulka naměřených hodnot annexinu V kontrolní skupiny.** Sloupec s označením týden gravidity označuje v kterém týdnu gravidity byl vzorek odebrán.

Pacientka č.	Týden gravidity	Koncentrace Annexinu V [U/ml]
1	7	13,9
2	7	33,6
3	9	10,2
4	8	13,2
5	10	39,5
6	9	22,1
7	9	28,7
8	10	15,2
9	10	18,9
10	11	30,0
11	8	19,5
12	10	30,7
13	7	26,3
14	10	14,9
15	8	13,0
	Průměr	22,0

**Tab. 3: Tabulka naměřených hodnot annexinu V skupiny s patologií (potratem).** Sloupec s označením týden gravidity označuje v kterém týdnu gravidity byl vzorek odebrán.

Pacientka č.	Týden gravidity	Koncentrace Annexinu V [U/ml]
1	8	25,7
2	9	19,8
3	9	55,9
4	7	32,6
5	9	15,2
6	10	29,7
7	8	13,2
8	10	28,8
Průměr		27,6



**Obr. 7: Grafické znázornění rozdílu mezi aritmetickým průměrem hodnoty annexinu V mezi kontrolní a patologickou skupinou.**

**Tab. 4: Vypočítané hodnoty aritmetických průměrů, směrodatných odchylek a průměrných směrodatných odchylek kontrolní a patologické skupiny.** Hodnoty uvedené v tabulce byly vypočteny na základě vztahů v kapitole 3.4 na str. 36-37.

$\bar{x}$ [U/ml]	$S_x$ [U/ml]	$S_{\bar{x}}$ [U/ml]
22,0	8,64	2,23
$\bar{y}$ [U/ml]	$S_y$ [U/ml]	$S_{\bar{y}}$ [U/ml]
27,6	12,5	4,42
$I_{xy}$	$t$	
0,550	1,51	

## 5 Diskuze

Fyziologická gravidita je přirozený proces. Jeho opakem je těhotenství ukončené potratem. Problematika potratů je v dnešní době pořád aktuálním tématem, i když to není nic nového. Nejčastěji jsou potraty způsobeny chromozomálními abnormalitami ve velmi raných embryích. Jiné důvody patologického výsledku těhotenství mohou být např. syndromy LUTO a RDS<sup>6,8</sup>. Syndrom RDS vzniká na základě nedostatku surfaktantu na plicích<sup>8</sup>. V běžné klinické praxi se hovoří o několika typech potratů a to, spontánní, zamlklý a indukovaný.

Porovnání potratovosti v České republice s jinými státy není úplně možné a to vzhledem k tomu, že jiné země nevedou tak podrobnou evidenci. Některé země jako Maďarsko, Slovensko a Rumunsko jsou zeměmi kromě České republiky s nejuplněnější statistikou ohledně potratů, zatím co země jako Švýcarsko a Belgie statistiky ohledně potratů vůbec nevedou<sup>40</sup>.

K řešení dané problematiky se dostáváme až nyní, s využitím moderní technologie. Pro vyloučení produktu početí z dělohy bez chirurgického zákroku se při zamlklém potratu využívá syntetický analog prostaglandinu E1 - misoprostol<sup>30</sup>. Mezi chirurgické metody, kterými je možné zabránit potratu patří např. cervikální cerkláž, která umožní donošení dítěte<sup>21</sup>. Diagnostika a prevence potratů je možná za pomoci sonografického přehledu, vyšetření plnosti močového měchýře plodu a screeningové testy pro odhalení chromozomálních aberací.

Mezi potencionální biomarkery byly zařazeny annexin V, PAPP-A a hCG. Annexin V byl zkoumán jako potencionální marker pro vizualizaci buněk v procesu apoptózy<sup>47</sup>. Pappalysin 1, známý i jako PAPP-A je regulátorem exprese růstového faktoru nezbytného pro normální vývoj plodu<sup>67</sup>. V klinické praxi se PAPP-A využívá na detekci Downova syndromu v prvním trimestru gravidity<sup>67</sup>. Lidský choriový gonadotropin je výhodným markerem pro zjištění zdali je žena těhotná, je měřitelný z krevního séra i z moči.

V praktické části bylo testováno zdali je annexin V vhodným biomarkerem, jehož vyšší hladiny by poukazovaly na zvýšené riziko potratu. Na základě ELISA testů krevních sér bylo zjištěno a statisticky vypočteno, že rozdíl mezi aritmetickým průměrem kontrolní a patologické skupiny byl statisticky významný na hladině významnosti  $\alpha = 0,20$ . Tudíž můžeme tvrdit s 80 % spolehlivostí, že annexin V je vhodným biomarkerem pro detekci a prevenci potratů. Běžně se v klinické praxi stanovuje



statisticky významný rozdíl na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . V našem případě tuto hladinu významnosti nebylo možné použít vzhledem k malému počtu pacientek v jednotlivých souborech. Malý počet zkoumaných vzorků byl způsoben přísnými kritérii při výběru pacientek do jednotlivých souborů tak, aby výběrový soubor charakterizoval primární soubor. Též nebylo možné využít  $\alpha = 0,05$  kvůli nepřesně naměřeným hodnotám annexinu V. Nepřesnosti mohly být způsobeny delším uskladněním vzorků, delším uskladněním soupravy pro stanovení annexinu V, nedokonalým pipetováním a také dlouhodobě nepoužívanou ELISA čtečkou vzorků.

## 6 Souhrn

Za pomoci analýzy ELISA bylo experimentálně zjištěno a statisticky vypočteno, že annexin V je v prvním trimestru vhodným markerem pro časnou detekci a prevenci potratů a to s 80 % spolehlivostí.

## Seznam literatury

[1] Shiel, W. C. Jr.: *Medicinal Definition of Pregnancy*. (2018). Dostupné z URL: <<https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=12507>> [cit. 12.2.2020]

[2] Stöppler, M. C.: *Stages of Pregnancy: Week by Week*. (2019). Dostupné z URL: <<https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=12507>> [cit. 12.2.2020]

[3] Office on Women's Health, Department of Health and Human Services US.: *Stages of Pregnancy*. Dostupné z URL: <<https://www.womenshealth.gov/pregnancy/youre-pregnant-now-what/stages-pregnancy>> [cit. 20.4.2020]

[4] Binder, T.: *Porodnictví*. Praha. Karolinum (2011)

[5] Nierenberg, C.: *Having a Baby: Stages of Pregnancy*. Dostupné z URL: <<https://www.livescience.com/44899-stages-of-pregnancy.html>> [cit. 13.2.2020]

[6] Haeri, S.: Fetal Lower Urinary Tract Obstruction (LUTO): a practical review for providers. *Matern Health Neonatol Perinatol*. 1:26 (2015)

[7] Lissauer, D.; Morris, R. K.; Kilby, M. D.: *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 6. vydání. Elsevier. (2007)

[8] Muntau, A. C.: *Pediatric*. 6. vydání. Praha. Grada Publishing. (2011).

[9] Texas Fertility Center.: *Biochemical pregnancy*. Dostupné z URL: <<https://www.fertilitysanantonio.com/female-infertility/biochemical-pregnancy/>>. [cit. 16. 2. 2020].

[10] Hoyert, D. L.; Gregory, E. C. W.: *Cause of fetal death: Data from the fetal death report. National vital statistics reports*. 7. vydání. Hyattsville. (2016)

- [11] Annan, J. J. K.; Gudi, A.; Bhide, P.; Shah, A.; Homburga, R.: Biochemical Pregnancy During Assisted Conception: A Little Bit Pregnant. *J Clin Med Res.* **5**:4 (2013).
- [12] Chard, T.: *Human reproduction*. 5. vydání. Oxford. Oxford University Press. (1992)
- [13] Murray, J.; Abraham, G.: Pseudocyesis: a review. *Obstet Gynecol.* **51**:5 (1978)
- [14] Brown, E.; Barglow, P.: Pseudocyesis: a paradigm for psychophysiological interactions. *Arch Gen Psychiatry.* **24**:3 (1971)
- [15] Guzinski, G.; Conrad, S.: Pseudocyesis and sonography. *Am J Obstet Gynecol.* **138**:2 (1980)
- [16] Bass, C.; Jones, D.: Psychopathology of perpetrators of fabricated or induced illness in children: case series. *Br J Psychiatry.* **199**:2 (2011)
- [17] Thippaiah, S.; George, V.; Birur, B.; Pandurangi, A.: A Case of Concomitant Pseudocyesis and Couvade Syndrome Variant. *Psychopharmacol Bull.* **48**:3 (2018)
- [18] James, A. H.: *Consultative Hemostasis and Thrombosis*. 4. vydání. Elsevier (2019)
- [19] Jacobson, J. D.; Zieve, D.: Miscariage. *MedlinePlus* (2018) Dostupné z URL: <<https://medlineplus.gov/ency/article/001488.htm>> [cit. 20.2.2020]
- [20] Dulay, A. T.: Spontaneous Abortion (miscarriage). *MSD Manual* (2019) Dostupné z URL: <<https://www.msmanuals.com/professional/gynecology-and-obstetrics/abnormalities-of-pregnancy/spontaneous-abortion>> [cit. 20.2.2020]
- [21] Alfirevic, Z.; Stampalija, T.; Medley, N.: Cervical stitch (cerclage) for preventing preterm birth in singleton pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* **6**:6 (2017)

- [22] Royal College of Obstetricians & Gynaecologists: *Cervical stitch*. Londýn (2018)  
Dostupné z URL: <<https://www.rcog.org.uk/en/patients/patient-leaflets/cervical-stitch/>>  
[cit. 25.2.2020]
- [23] Reinhard, G.; Noll, A.; Schlebusch, H.; Mallmann, P.; Ruecker, A. V.: Shifts in the TH1/TH2 Balance during Human Pregnancy Correlate with Apoptotic Changes. *Biochem Biophys Res Commun.* **245**:3 (1998)
- [24] Hájek, Z.; Čech, E.; Maršál, K.: *Porodnictví*. 3. vydání. Praha. Grada Publishing (2014).
- [25] Taylor, P. A.: The Ever-Expanding T-Cell World: A Primer. *TheScientist* (2017)  
Dostupné z URL: <<https://www.the-scientist.com/news-analysis/the-ever-expanding-t-cell-world-a-primer-31123>> [cit. 25.2.2020]
- [26] Wood, S. L.; Brian, P. H.: Medical management of missed abortion: a randomized clinical trial. *Obstet Gynecol.* **99**:4 (2002)
- [27] Joint study of Royal College of general practitioner and Royal College of obstetrician and gynaecologist: Induced abortion operations and their early sequelae. *J R Coll Gen Pract.* **35**:273 (1985).
- [28] Chia, K. V.; Ogbo, V. I.: Medical termination of missed abortion. *J Obstet Gynaecol.* **22**:2 (2002)
- [29] Petrou, S.; Trinder, J.; Brocklehurst, P.; Smith, L.: Economic evaluation of alternative management methods of first-trimester miscarriage based on results from the MIST trial. *BJOG.* **113**:8 (2006)
- [30] Neilson, J. P.; Hickey, M.; Vanquez, J.: Medical treatment for early fetal death (less than 24 weeks). *Cochrane Database Syst Rev.* **3** (2006)

- [31] Zhang, J.; Gilles, J. M.; Barnhart, K.; Creinin, M. D.; Westhoff, C.; Frederick, M. M.: A comparison of medical management with misoprostol and surgical management for early pregnancy failure. *N Engl J Med.* **353**:8 (2005)
- [32] Anderson, J.; Gouk, E.; Young, L.; Turnbull, L.; Sayeed, G.; Elattar, A.; Cruickshank, D.: A randomised controlled trial of oral versus vaginal misoprostol for medical management of early fetal demise. *Int J Gynecol Obstet.* **107**:2 (2009)
- [33] Kushwah, D. S.; Kushwah, B.; Salman, M. T.; Verma, V. K.: Acceptability and safety profile of oral and sublingual misoprostol for uterine evacuation following early fetal demise. *Indian J Pharmacol.* **43**:3 (2011)
- [34] Tang, O. S.; Gemzell-Danielsson, K.; Ho, P. C.: Misoprostol: Pharmacokinetic profiles, effects on the uterus and side-effects. *Int J Gynecol Obstet.* **99**:2 (2007)
- [35] Rigterink, E. S.; Saftlas, A. F.; Atrash, H. K.: *Women and Health*. 2. vydání. Academic press. (2013)
- [36] Stubblefield, P. G.; Carr-Ellis, S.; Borgatta, L.: Methods for induced abortion. *Obstet Gynecol.* **104**:1 (2004)
- [37] Kolesová, I.: Kontroverzní téma jménem potraty. *Hospodářské noviny* (2007) Dostupné z URL: <<https://ihned.cz/c1-21745990-kontroverzni-tema-jmenem-potraty>> [cit. 23.3.2020]
- [38] Hůle, D.: Historie potratovosti. *Demografie*. (2014) Dostupné z URL: <[http://demografie.info/?cz\\_potratovosthistorie](http://demografie.info/?cz_potratovosthistorie)> [cit. 23.3.2020]
- [39] Zákony pro lidi.: Zákon ČNR č. 66/1986 Sb. *AION CS*. (2020) Dostupné z URL: <<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1986-66>> [cit. 24.3.2020]
- [40] Škrabal, J.: Vývoj potratovosti v České republice. *Český statistický úřad*. (2015) Dostupné z URL: <<https://www.czso.cz/csu/czso/vyvoj-potratovosti-v-ceske-republice-2003-az-2014>> [cit. 23.3.2020]

- [41] Fernandez, H.; Campas, P.: *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. 2. vydání. Academic Press. (2019)
- [42] Gregor, V.; Šípek, A.; Šípek, A. jr.; Horáček, J.; Langhammer, P.; Petržílková, L.; Calda, P.: Prenatální diagnostika chromozomálních aberací Česká republika 1994 - 2007. *Čes Gynec* . **74**:1 (2009)
- [43] Medical Dictionary: Biochemical Marker. *Farlex and Partners*. (2009) Dostupné z URL: <<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/biochemical+marker>> [cit. 2.4.2020]
- [44] Waisman, D. M.: *Signal Transduction Mechanisms. Developments in Molecular and Cellular Biochemistry*. 15. vydání. Boston. Springer. (1995)
- [45] Crompton, M. R.; Owens, R. J.; Totty, N. F.; Moss, S. E.; Waterfield, M. D.; Crumpton, M. J.: Primary structure of the human, membrane-associated Ca<sup>2+</sup>-binding protein p68 a novel member of a protein family. *EMBO J*. **7**:1 (1988)
- [46] Parente, L.; Solito, E.: Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm res*. **53** (2004)
- [47] Boersma, H. H.; Kietselaer, B. L. J. H.; Stolk, L. M. L.; Bennaghmouch, A.; Hofstra, L.; Narula, J.; Heidendal, G. A. K.; Reutelingsperger, C. P. M.: Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med*. **46**:12 (2005)
- [48] Andree, H. A.; Reutelingsperger, C. P.; Hauptmann, R.; Hemker, H. C.; Hermens, W. T.; Willems, G. M.: Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*. **265**:9 (1990)
- [49] Huber, R.; Romisch, J.; Paques, E. P.: The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J*. **9**:12 (1990)

- [50] Huber, R.; Schneider, M.; Mayr, I.; Romisch, J.; Paques, E. P.: The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett.* **275**:(1-2) (1990)
- [51] Meers, P.; Mealy, T.: Relationship between annexin V tryptophan exposure, calcium, and phospholipid binding. *Biochem.* **32**:20 (1993)
- [52] Oling, F.; Santos, J. S. O.; Govorukhina, N.; Dubut, C. M.; Schutter, W. B.; Oostergetel, G.; Keegstra, W.; Lambert, O.; Bentley, A. L.; Brisson, A.: Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: a hybrid cryo-EM-X-Ray crystallography study. *J Mol Biol.* **304**:4 (2000)
- [53] Reviakine, I.; Bergsma-Schutter, W.; Brisson, A.: Growth of protein 2-D crystals on supported planar lipid bilayers imaged in situ by AFM. *J Struct Biol.* **121**:3 (1998)
- [54] Olofsson, A.; Mallouh, V.; Brisson, A.: Two-dimensional structure of membrane-bound annexin V at 8.0 Å resolution. *J Struct Biol.* **113**:3 (1994)
- [55] Mosser, G.; Ravanat, C.; Freyssinet, J. M.; Brisson, A.: Sub-domain structure of lipid-bound annexin V resolved by electron image analysis. *J Mol Biol.* **217**:2 (1991)
- [56] Voges, D.; Berendes, R.; Burger, A.; Demange, P.; Baumeister, W.; Huber, R.: Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. A correlative electron microscopy-X-ray crystallography study. *J Mol Biol.* **238**:2 (1994)
- [57] Oling, F.; Bergsma-Schutter, W.; Brisson, A.: Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *J Struct Biol.* **133**:1 (2001)
- [58] Bouter, A.; Gounou, C.; Bérat, R.; Tan, S.; Gallois, B.; Granier, T.; Estaintot, B. L.; Poschl, E.; Brachvogel, B.; Brisson, A. R.: Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun.* **2**:270 (2011),

- [59] Demchenko, A. P.: Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotech.* **65**:2 (2013)
- [60] Balasubramanian, K.; Schroit, A. J.: Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death. *Annu Rev Physiol.* **65** (2003)
- [61] Miyanishi, M.; Tada, K.; Koike, M.; Uchiyama, Y.; Kitamura, T.; Nagata, S.: Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature.* **450**:7168 (2007)
- [62] Henson, P. M.; Bratton, D. L.; Fadok, V. A.: The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev, Mol Cell Biol.* **2**:8 (2001)
- [63] Hanayama, R.; Tanaka, M.; Miwa, K.; Shinohara, A.; Iwamatsu, A.; Nagata, S.: Identification of a factor that links apoptic cells to phagocytes. *Nature.* **417**:6885 (2002)
- [64] Maiti, S. N.; Balasubramanian, K.; Ramoth, J. A.; Schroit, A. J.: Beta-2-glycoprotein 1-dependent macrophage uptake of apoptic cells: Binding to LRP receptor family members. *J Biol Chem.* **283**:7 (2008)
- [65] Kenis, H.; Genderen, H.; Deckers, N. M.; Lux, P. A. G.; Hofstra, L.; Narula, J.; Reutelingsperger, C. P. M.: Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp Cell Res.* **312**:6 (2006)
- [66] Chishti, A.; Klei, I.; Schmitz, L.; Khan, S.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 6. vydání. Elsevier. (2008)
- [67] Kalousová, M.; Muravská, A.; Zima, T.: Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) and preeclampsia. *Adv Clin Chem.* **63** (2014)
- [68] Montagnana, M.; Trenti, T.; Aloe, R.; Cervellin, G.; Lippi, G.: Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics. *Clin Chim Acta.* **412**:(17-18) (2011)
- [69] Betz, D.; Fane, K.: *Human Chorionic Gonadotropin (HCG).* Treasure Island. StatPearls Publishing. (2020)



- [70] Leao, R. B.; Esteves, S. C.: Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics (Sao Paulo)*. **69**:4 (2014)
- [71] Cole, L. A.: Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem*. **43**:12 (1997)
- [72] Greene, D. N.; Schmidt, R. L.; Kamer, S. M.; Grenache, D. G.; Hoke, C.; Lorey, T. S.: Limitations in qualitative point of care hCG test for detecting early pregnancy. *Clin Chim Acta*. **415** (2013)
- [73] Montoya, J. G.; Liesenfeld, O.: Toxoplasmosis. *Lancet*. **363**:9425 (2004)
- [74] Wong, S. Y.; Remington, J. S.: *Clinical Infectious Diseases*. 6. vydání. Oxford University Press. (1994)
- [75] Šmelko, Š.: *Štatistické metódy v lesníctve*. 4. vydání. Zvolen. Technická univerzita (1995)