

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Antoniana Žufíć**

## **Biochemické metody v prenatální diagnostice**

Biochemical methods in prenatal diagnostics

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Konzultant-školitel: Ing. Andrea Kestlerová

Praha, 2020

## **Prohlášení**

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

V Praze dne .....

Podpis: .....

Antoniana Žufíć

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za pomoc a vedení této bakalářské práce. Také děkuji konzultantce této práce, Ing. Andree Kestlerové za pomoc a vedení při realizování experimentální části. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za trpělivost a za to že vždy stojí při mně.

## **Abstrakt**

Úvodní část práce je přehledem literárních údajů o preeklampsii, a to zejména z hlediska možnosti potenciálních biochemických markerů tohoto patologického stavu.

V experimentální části byla studována možnost využít jako takového biomarkeru annexinu V. Srovnání souborů normálních těhotenství ( $n_x = 16$ ) a souboru patologických těhotenství s preeklampsií ( $n_y = 27$ ), u nichž byly metodou ELISA stanoveny koncentrace annexinu V ve krvi ukazuje, že mezi těmito skupinami není signifikantní rozdíl (a to ani na hladině významnosti 80 %). Annexin V se proto nejví vhodným kandidátem pro biochemickou diagnostiku preeklampsie.

## **Klíčová slova**

preeklampsie, imunochemická diagnostika, ELISA, annexin V, biochemická diagnostika, placentární růstový faktor, interleukiny

## **Abstract**

The introductory part of the thesis is an overview of data from the literature on preeclampsia, namely in terms of the possibility of potential biochemical markers of this pathological condition.

In the experimental part, the possibility of using annexin V as such a biomarker was studied. The comparison of normal pregnancies ( $n_x = 16$ ) and the pregnancies stricken with preeclampsia ( $n_y = 27$ ), in which, using the ELISA method, the level of annexin V in blood were shown, shows that there is not a significant difference between these groups (even at the 80 % significance level). Annexin V therefore does not appear to be a suitable candidate for the biochemical diagnosis of preeclampsia.

## **Key words**

preeclampsia, immunochemical diagnostics, ELISA, annexin V, biochemical diagnostics, placental growth factor, interleukins

# Obsah

1.	Úvod.....	9
1.1	Preeklampsie.....	10
1.1.1	Klinické projevy.....	12
1.1.2	Průběh těhotenství a diagnostika .....	14
1.1.3	Biochemie a příčiny preeklampsie.....	19
1.1.4	Léčení .....	23
1.1.5	Následky preeklampsie.....	24
1.1.6	Těžká a poporodní preeklampsie .....	25
1.2	Eklampsie .....	26
1.3	Jiné patologie související s preeklampsii .....	27
1.3.1	Gestační hypertenze .....	27
1.3.2	Intrauterinní růstová retardace (IUGR).....	27
1.3.3	HELLP syndrom .....	29
1.4	Markery .....	30
1.4.1	Protilátky proti kardiolipinům .....	31
1.4.2	Placentární růstový faktor.....	31
1.4.3	Interleukiny.....	32
2	Cíl práce.....	33
3	Materiál a metody .....	34
3.1	Materiál.....	34
3.1.1	Vzorky.....	34
3.2	Postup práce.....	35
3.3	Přístroje.....	36
4	Výsledky.....	37
5	Diskuse .....	39
6	Souhrn.....	41
7	Seznam literatury .....	42

## Seznam zkratk a symbolů

<b>PE</b>	Preeklampsie
<b>HELLP syndrom</b>	Z ang.: Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets
<b>MAP</b>	Střední arteriální tlak
<b>sTK</b>	Systolický tlak krve
<b>dTK</b>	Diastolický tlak krve
<b>PAPP-A</b>	Plazmatický protein A spojený s těhotenstvím
<b>PIGF</b>	Placentární růstový faktor
<b>sFlt-1</b>	Rozpustná fms-podobná tyrosinkinasa typu 1
<b>PI UtA</b>	Index pulsatility děložních tepen
<b>VEGF</b>	Vaskulární endoteliální růstový faktor
<b>VEGFR1</b>	Receptor 1 vaskulárního endoteliálního růstového faktoru
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transformující růstový faktor – BETA
<b>sENG</b>	Rozpustný endoglin
<b>hCG</b>	Lidský choriový gonadotropin
<b>IgA</b>	Imunoglobulin A
<b>TNF</b>	Faktor nádorové nekrózy
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>LDL</b>	Lipoprotein nízké hustoty
<b>NK-buňky</b>	Subpopulace leukocytů („natural killers“ – přirozené zabíječské buňky)
<b>HLA</b>	Lidský leukocytární antigen
<b>HIF-1</b>	Hypoxií indukovaný faktor 1
<b>KIR</b>	Receptor zabíječských buněk podobný imunoglobulinu

<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>rRNA</b>	Ribosomální ribonukleová kyselina
<b>IUGR</b>	Intrauterinní růstová retardace
<b>CNS</b>	Centrální nervový systém
<b>MLC kinasa</b>	Kinasa lehkého myozinového řetězce
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartát
<b>SGA</b>	(Plod) Malý na gestační věk
<b>PP-13</b>	Placentární protein 13
<b>VLDL</b>	Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou
<b>ACLA</b>	Protilátky proti kardiolipinům
<b>APLA</b>	Protilátky proti fosfolipidům
<b>ELISA metoda</b>	Z ang.: enzyme-linked immunosorbent assay
<b>Rpm</b>	Z ang.: rotations per minute



# 1. Úvod

Fyziologické těhotenství je těhotenství u ženy bez rizikových faktorů v anamnéze a s výsledky všech klinických i laboratorních výsledků v mezích normy<sup>1</sup>.

Úplné těhotenství trvá 280 dnů aneb 40 týdnů, tj. tři trimestry.

Nový lidský život začíná v okamžiku oplodnění, kdy jedna z velkého počtu spermií proniká do těsné blízkosti vajíčka, prostupuje jeho obalem a vnáší do něj 23 otcovských chromozomů. Ty se tak připojí k podobným 23 chromozomům mateřským.

Vajíčko se záhy po oplodnění začíná intenzivně dělit nejdříve na dvě, potom na čtyři, osm a stále více buněk. Při každém dalším buněčném dělení, které následuje, se stejná sestava 46 chromozomů zdvojuje a předává do všech nově vznikajících buněk<sup>2</sup>.

Šestý den po početí se lidský zárodek (embryo) začíná uhnízdňovat v děloze. V té době je embryo kulovitým shlukem buněk s vnitřní dutinkou. Čtrnáctý den má již dvě oddělené zárodečné vrstvy buněk. V té době je uhnízdění zárodku v děloze úspěšně završeno a začíná se vyvíjet placenta, která bude po celou dobu nitroděložního života zprostředkovávat látkovou výměnu mezi tělem plodu a matky. Ve třetím týdnu vznikne další, třetí vrstva buněk embrya a základ nervové trubice, předstupeň pozdějšího mozku a míchy. Objevují se první krevní cévy a začíná pracovat srdíčko.

Mezi čtvrtým a osmým týdnem svého vývoje získává embryo postupně podobu člověka. Objevuje se základ ručiček a nožiček, svalů, obratlů, horní a dolní čelisti, patra, oušek a dalších částí hlavičky a krku. V místě, kde později budou oči, lze rozpoznat základ očních čoček. Nejrychleji roste mozek. V osmém týdnu má již embryo vytvořený základ všech budoucích orgánů lidského těla. Průměrně velký zárodek na přelomu 8. a 9. týdne, kdy mu začínáme říkat plod, váží 9 gramů a měří 5 centimetrů<sup>2</sup>.

Obdobím vývoje plodu (fetálním obdobím) nazýváme dobu od počátku 9. týdne nitroděložního života do narození. Od začátku fetálního vývoje se jednotlivé části těla plodu zvětšují, narůstá počet jejich buněk a dotváří se jejich podoba. V 10 týdnech má plod již nezaměnitelně lidskou tvář. V téže době se dotváří i konečná podoba trávicího ústrojí. Ve 12 týdnech je ukončen vývoj základu zevních pohlavních orgánů. Začínají se vyvíjet plíce. Do 24. týdne pokročí vývoj plic plodu natolik, že v případě předčasného narození mohou začít dýchat, i když jen s podporou přístrojů.

Drobné svalové stahy se objevují již kolem 8. vývojového týdne, tedy v samém závěru embryonálního období. Ve 13. a 14. týdnu začíná plod polykat plodovou vodu a naznačuje dýchací pohyby. Postupně se učí reagovat pohybem na dotyk. Kolem 17. týdne už dotyk ve dlani vyvolá úchop ruky. Tento "úchopový reflex" se plně rozvine do 27. týdne. Ve 26. týdnu plod poprvé otevírá oči<sup>2</sup>.

Do délky roste plod relativně nejrychleji mezi 4. a 6. měsícem těhotenství. Hmotnost plodu však výrazněji stoupá až v posledních třech nitroděložních měsících, počínaje 25. týdnem těhotenství. Za tyto tři měsíce se hmotnost ztrojnásobí. Tělo plodu si v té době vytváří zásoby bílkovin, tukové tkáně, železa i vápníku na dobu po narození. V samém závěru nitroděložního života a první půlrok po narození rostou rychleji chlapani než děvčata, protože si v této době přechodně produkují určité množství mužských pohlavních hormonů. Teprve poté produkce pohlavních hormonů utichá a obnovuje až na prahu dospívání<sup>2</sup>.

## 1.1 Preeklampsie

Těhotenství je jednou z největších fyziologických výzev, které mohou ženy zažít. Fyziologické adaptace, které provázejí těhotenství, mohou zvýšit riziko vzniku řady poruch, které mohou vést k akutním i chronickým patofyziologickým následkům<sup>3</sup>.

Preeklampsie je porucha, která se vyskytuje pouze během těhotenství a po porodu a může postihnout i matku i nenarozené dítě. Postihuje nejméně 5–8 % všech těhotenství, jedná se o rychle progresivní stav charakterizovaný krevním tlakem vyšším než 140/90 a přítomností bílkovin v moči (více než 300 mg za 24 hodin). Preeklampsie se objevuje na konci druhého nebo třetího trimestru nebo ve středním až pozdním těhotenství, tj. po 20 týdnech těhotenství a až do šesti týdnů po porodu. Ve vzácných případech se může vyskytnout dříve než ve 20. týdnu<sup>4</sup>.

Zatímco příčina preeklampsie je stále diskutována, klinické a patologické studie naznačují, že placenta je ústřední pro patogenezi tohoto syndromu<sup>5</sup>.

Patofyziologii preeklampsie je možné zjednodušeně charakterizovat redukovanou placentální perfuzí s následnou ischemií placenty. Správná funkce placenty závisí na diferenciaci trofoblastů – specializovaných buněk, které přímo spojují embryo s matkou. Tyto buňky existují ve dvou formách: jako syncytiotrofoblast a invazivní trofoblast. Pokud není trofoblast dostatečně diferencován, jsou spirální arterie placenty nedostatečně

přízpůsobeny, placenta je vystavena hypoxii a neplní správně všechny fyziologické funkce, což přináší vážné komplikace pro matku i plod<sup>6</sup>.

Současní autoři dávají vznik preeklampsie do příčinné souvislosti nejčastěji s cirkulujícími faktory inhibujícími angiogenezi, nebo se signální drahou angiotenzin II a interferencí s mateřským vaskulárním systémem<sup>6</sup>. Jako další faktory podílející se na vzniku a rozvinutí patologie jsou označovány oxidativní stres, zánětlivá reakce, špatná adaptace oběhového systému nebo humorální a metabolické abnormality. Imunologická stránka onemocnění pravděpodobně zahrnuje špatnou adaptaci organismu matky, kdy plod a placenta jsou odmítány obdobně jako štěp u alogenních transplantací. Při rozvoji preeklampsie se uplatňují i genetické predispozice<sup>6</sup>.

Ve srovnání s normotenzním těhotenstvím, u preeklampsie bývá snížená plazmatická hladina reninu, angiotenzinogenu, angiotenzinu II, aldosteronu a pravděpodobně i enzymu konvertujícího angiotenzin<sup>7</sup>.

Rizikové faktory pro vývoj PE lze rozdělit do dvou základních skupin: stavy se zvýšeným nárokem na kyslík a stavy se sníženým přenosem kyslíku. Do první skupiny patří vícečetné těhotenství, hydatiformní mola a hydropická placenta. Do druhé skupiny patří primigravidy (ženy které byly nebo jsou těhotné poprvé), onemocnění cévní--mikrovaskulární (hypertenze, *diabetes mellitus*, onemocnění pojiva) a abnormální placentace<sup>7</sup>.

Podle parity, tj. počtu porodů, preeklampsie se vyskytuje v 10–14 % primipar, a v 5–7 % u multipar<sup>8,9</sup>.

Další rizikové faktory pro vývoj preeklampsie jsou první těhotenství, předchozí těhotenství zatížené preeklampsií, výskyt preeklampsie v rodině, věk matky pod 18 let nebo nad 35 let, obezita (BMI > 30), autoimunitní onemocnění, onemocnění ledvin, kardiovaskulární onemocnění, oplodnění in vitro, rasa, interval mezi dvěma těhotenstvími, polycystická ovaria, antifosfolipidový syndrom atd.<sup>10,11,12</sup>.

Navzdory četným studiím a závažnosti této poruchy, ještě pořád zůstává nejasné, co přesně tuto nemoc způsobuje, a i přes dobře známé rizikové faktory, predikce preeklampsie není 100 % účinná.

Preeklampsie dodnes ve světě zůstává na 2. místě (v České republice na 5. místě) v příčinách smrti u těhotných<sup>12</sup>.

### 1.1.1 Klinické projevy

Preeklampsie je definovaná pomocí hypertenze, tj. zvýšeného krevního tlaku. Platí, že při dvou měřeních v rozmezí 6 hodin, je systolický krevní tlak rovný nebo větší než 140mmHg a diastolický tlak 90 mmHg a vyšší. Taktéž se může měřit změna tlaku oproti předchozí kontrole, kdy vzestup systolického o 30 mmHg a diastolického o 15 mmHg naznačují problém<sup>7,13,14</sup>.

Kromě hypertenze je přítomná i proteinurie, a to více než 300 mg během 24 hodin. Pokud je přítomný pouze vysoký krevní tlak, avšak koncentrace proteinů v moči je menší než podle definice, jedná se o gestační hypertenzi s mikroalbuminurií (močová exkrece albuminu 30-300 mg za 24 hodin)<sup>15</sup>. V takovém případě nejsou přítomná rizika takové závažnosti jako u PE. Oproti tomu u PE může být přítomná oligurie menší než 400 ml za 24 hodin<sup>14,16</sup>.

Zvýšená hladina proteinů v moči se může změřit různými způsoby. Může se použít testovací papírek, který počtem křížků (+) ukáže zvýšenou hladinu proteinů v moči. Princip metody spočívá na takzvané bílkovinné chybě acidobazického indikátoru, např. tetrabromfenolové modři nebo ethylesteru tetrabromfenolftaleinu. Tyto látky při určitém pH mění svou barvu, při pH nižším než 3,5 jsou žluté, při vyšším pH jsou zelené až modré<sup>17</sup>. V tomto případě se ale, kvůli nízké senzitivitě a nízké specifičnosti, jedná pouze o přibližnou hodnotu, ovlivněnou pH i hustotou moči. Na rozdíl od testovacích proužků, test s 20 % kyselinou sulfosalicylovou, která sráží bílkoviny v moči, reaguje přibližně stejně se všemi vylučovanými proteiny. U tohoto testu se vyšší koncentrace bílkovin v moči prokáže ve formě vzniklého zákalu anebo sraženiny<sup>18,19</sup>.

Za nejspeciřtější metodu pro stanovení celkové proteinurie se pokládá biuretová metoda, při které se vzorek nejdříve smíchá s kyselinou trichloroctovou, a po centrifugaci se do precipitátu přidá biuretové činidlo. Při reakci vzniká modrofialový komplex, který se změří spektrofotometricky, přičemž intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku<sup>19,17</sup>.

Metody turbidimetrie a nefelometrie předpokládají tvorbu sraženin proteinů a jsou založené na měření stupně zákalu-turbidity. Precipitace se provádí sulfosalicylovou nebo trichloroctovou kyselinou, případně protilátkami. Při dopadu záření určité vlnové délky na heterogenní částice v koloidních roztocích a suspenzích dochází k odrazu, lomu

a částečné absorpci tohoto záření, a přitom se rozptýlené světlo může stanovit spektrofotometricky. Tyto metody stanovují jednotlivé bílkoviny kvantitativně<sup>17,20</sup>.

Kromě těchto metod, pro stanovení proteinurie lze měřit i poměr proteinu a kreatininu, při čem tento poměr, když je zvýšený, může předpovídat další problémy, jako např. HELLP syndrom a plicní edém matky<sup>21,22</sup>.

Další znaky PE jsou bolesti hlavy, problémy s viděním, rozsáhlé edémy, které se nejprve projeví v dolních končetinách atd.<sup>11,14</sup>.

Přítomnost edémů se předtím brala jako součást definice PE, od čehož se později upustilo, protože se edémy obecně vyskytují i u fyziologických těhotenství, a např. v létě jsou větší. Někteří vědci konstatují že se o edémy doprovázející PE jedná až tehdy, když jsou přítomné např. na obličeji nebo na konečcích prstů. Obecně lze ale konstatovat, že s masivností edémů se zhoršuje stav PE.

Další laboratorní ukazatele jsou zvýšená hladina kyseliny močové a kreatininu v séru (v důsledku zhoršené funkce ledvin), vzestup aminotransferas jako znak poškození hepatocytu (alaninaminotransferasa a aspartátaminotransferasa), vzestup hematokritu nad 40 %. Jestli je přítomný i pokles trombocytů, doprovázený hemolýzou a zvýšením jaterních enzymů, jedná se už o další patologii, která může doprovázet PE, tj. HELLP syndrom<sup>16,23</sup>.

Všechny předem napsané klinické projevy PE a některé navíc jsou uvedené v Tab.1. (str. 14).

Tab.1. Diagnostická kritéria preeklampsie. Převzato dle<sup>24</sup>, upraveno.

<b>Preeklampsie je definována jako gestační hypertenze spojená s mateřskou nebo uteroplacentární dysfunkcí při 20 nebo po 20 týdnu gestace</b>	
<b>Gestační hypertenze</b>	
Systolický krevní tlak $\geq 140$ a/nebo diastolický krevní tlak $\geq 90$ mmHg Měl by se používat sfygmomanometr s tekutými krystaly s manžetou vhodné velikosti. Nebo, pokud není k dispozici, vhodně kalibrované automatizované zařízení.	
<b>Doprovázeno <math>\geq 1</math> z následujících nově vznikajících komplikací:</b>	
Proteinurie	Počáteční hodnocení s automatickou analýzou vzorku moče. Pokud není k dispozici, lze použít vizuální analýzu. Pokud je vzorek pozitivní ( $\geq 1+$ ), potvrďte bodovou močí. Abnormální, pokud protein/kreatinin $\geq 30$ mg/mmol nebo albumin/kreatinin $\geq 8$ mg/mmol
Renální komplikace	Akutní poškození ledvin (kreatinin $\geq 90$ $\mu\text{mol/l}$ )
Jaterní komplikace	Zvýšené transaminasy, s přítomností nebo bez přítomností bolesti v pravém horním kvadrantu břicha
Neurologické komplikace	Eklampsie, změněný duševní stav, slepota, mrtvice, klon, těžká a přetrvávající vizuální skotomata
Hematologické komplikace	Trombocytopenie (počet krevních destiček $< 150000/\mu\text{l}$ , diseminovaná intravaskulární koagulace, hemolýza)
Uteroplacentální dysfunkce	Omezení růstu plodu, abnormální analýza dopplerovských vln pupečnickové tepny, mrtvorozenost

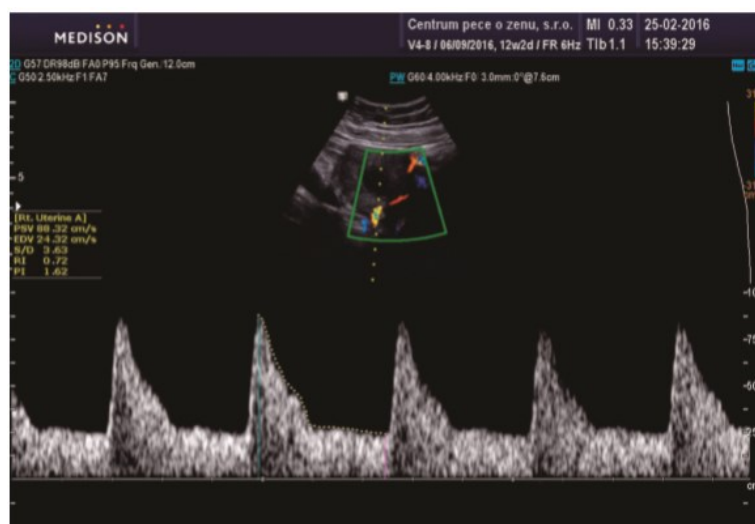
### 1.1.2 Průběh těhotenství a diagnostika

Základní komplikací PE je projev klinických příznaků až v pozdní fázi těhotenství, kvůli kterému je hlavní prioritou nalezení vhodných screeningových testů, které by pomohly odhalit riziko této patologie před vlastním projevem této patologie.

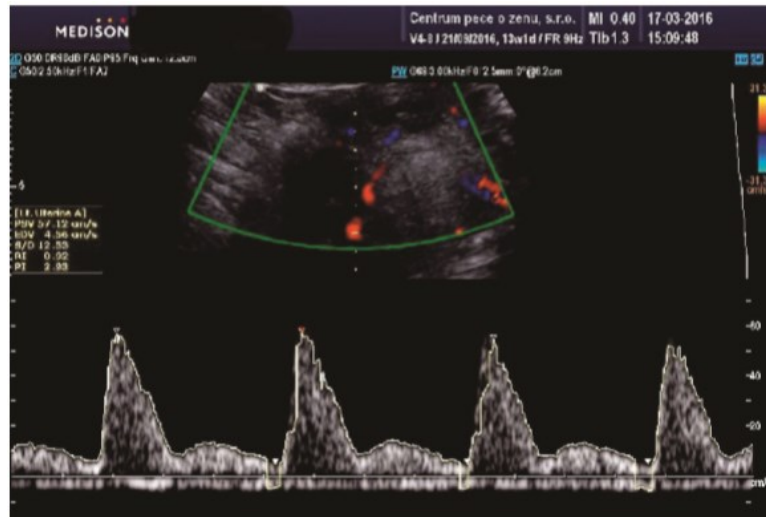
Nejčastější diagnostické metody:

- a) hodnocení anamnestických rizikových faktorů
- b) biofyzikální – střední arteriální tlak ( $MAP = (sTK + 2 \times dTK) / 3$ ) a dopplerovské ultrazvukové měření uterinních arterií
- c) biochemické (PAPP-A, PIGF, sFlt, ...) <sup>25</sup>

Dopplerovské zobrazení a měření průtoku uterinních arterií (PI UtA) jsou neinvazivní metody nepřímo hodnotící uteroplacentární cirkulaci v průběhu celého těhotenství (Obr.1). U preeklampsie abnormální placentace rezultuje v neadekvátní uteroplacentární perfuzi. Nízký enddiastolický tok a pokles toku v časně diastole (přítomnost zářezu, tzv. „notch“) můžeme vidět v uterinních arteriích u netěhotných žen nebo v prvním trimestru, pokud přetrvává „notch“ v druhém trimestru (zejména po 24. týdnu), tak je nález asociován s neadekvátní trofoblastickou invazí. Hodnoty PI UtA se během gravidity postupně snižují, kolem termínu porodu se mohou nepatrně zvýšit. Při hodnocení nálezu je důležité zohlednit fakt, že na průtok krve dělohou mají vliv tři faktory – arteriální tlak, venózní tlak a cévní rezistence. Při preeklampsii vysoká rezistence v uterinních arteriích má za následek abnormální tvar křivky, pro který je typický vysoký PI UtA a přítomnost „notche“ (Obr.2) <sup>25</sup>.



Obr.1. Normální flowmetrie uterinních arterií. Převzato dle<sup>25</sup>.



Obr.2. Abnormální tvar křivky při PE (přítomnost „notche“). Převzato dle<sup>25</sup>.

Na základě metaanalýzy více studií je abnormální ultrazvukový nálezn v prvním a zejména ve druhém trimestru považován za vhodný screeningový test závažnosti a progresu preeklampsie. Přítomnost „notche“ v třetím trimestru vypovídá o riziku pozdní PE<sup>25</sup>.

U žen, které postihne PE, dochází k inhibici angiogeneze vzhledem ke změnám koncentrace faktorů cirkulujících v jejich těle. Dochází k poklesu proangiogenních faktorů jako VEGF, PlGF, TGF- $\beta$  a vzestupu faktorů s antiangiogenním účinkem sFlt-1 (váže VEGF a PlGF) a sENG (snižuje vazodilatační účinek oxidu dusnatého). Na rozdíl od normálního těhotenství, které je charakterizováno poklesem hladin sENG z prvního do druhého trimestru a bez významné změny sFlt-1, u pacientů, u kterých se rozvine preeklampsie, koncentrace sFlt-1 a sENG nadále stoupají od prvního do druhého trimestru<sup>26,27</sup>.

Kromě těchto markerů jsou v těhotenstvích, u nichž se vyvinula PE, zvýšené hodnoty MAP a PI UtA a výrazně je snížena hodnota PAPP-A. U časných PE vykazují veškeré biomarkery vyšší odchylku od normálu, než je tomu u pozdních preeklamsií. Screening proto může předpovědět nutnost provedení císařského řezu již v nižších týdnech gravidity z důvodu vitálního ohrožení matky nebo plodu<sup>28,29</sup>.

Všechny tyto markery jsou neefektivnější, když jsou kombinovány mezi sebou, a screening, pro jednočetné gravidity, je neefektivnější, když se provádí ve dvoustupňové strategii. První fáze, která má probíhat v období mezi 11. a 13. týdnem těhotenství, by



měla být primárně zaměřena na účinnou predikci „early-onset“ PE (PE která se objeví před 34. týdnem), protože prevalence tohoto stavu může být výrazně snížena profylaktickým podáváním nízkých dávek aspirinu před 16. týdnem těhotenství. Druhá fáze, probíhající kolem 30. až 33. týdne, by měla být zaměřena na účinnou predikci „late-onset“ PE (vyžadující porod po 34. týdnu nebo později). Pečlivé sledování takových těhotenství pro včasnou diagnózu klinických příznaků nemoci by potenciálně mohlo zlepšit perinatální výsledek prostřednictvím takových zásahů, jako je podávání antihypertenziv a včasný porod<sup>30</sup>.

Kombinovaný screening mezi 11. a 13. týdnem podle mateřských faktorů, PI UtA, MAP a PIGF předpovídá 75 % předčasné preeklampsie a 47 % preeklampsie v termínu<sup>28</sup>.

Screening mezi 19. a 24. týdnem s použitím jenom mateřských faktorů předpovídá PE z 52 % pro časnou PE (porod potřebný před 32. týdnem těhotenství), 47 % pro předtermínovou (porod potřebný před 37. týdnem) a 37 % pro termínovou PE (porod potřebný v nebo po 37. týdnu). Na rozdíl od toho, když jsou tyto faktory kombinované s MAP, PI UtA a PIGF, screening předpovídá 99 % pro časnou, 85 % pro předtermínovou a 46 % pro termínovou PE<sup>29</sup>.

Kombinovaný screening mateřských faktorů + MAP + PI UtA + PIGF + sFlt mezi 30. a 34. týdnem předpovídá 98 % předtermínové a 49 % termínové PE<sup>31</sup>.

Mezi 35. a 37. týdnem kombinace těchto samých markerů může předpovědět 35 % předtermínové a 84 % termínové PE<sup>32</sup>.

Na základě kombinovaného poměru sFlt-1/PIGF lze rozeznat normální průběh těhotenství od těhotenství komplikovaného preeklampií, a proto se výpočet tohoto poměru stal rutinně využívaným biochemickým testem<sup>25,26</sup>.

Další markery, které je vhodné sledovat v prvním trimestru jsou jednak běžné biochemické markery – sérové imunoglobuliny, C3 a C4 složka komplementu, beta podjednotka choriového gonadotropinu (free-beta hCG), a jednak imunologické markery jako jsou např. protilátky proti kardiolipinům (eventuálně dalším fosfolipidům), protilátky proti beta2-glykoproteinu 1 a revmatoidní faktor<sup>33,34</sup>.

Koncentrace sérových imunoglobulinů IgA, IgM a IgG v preeklamptickém těhotenství jsou, v porovnání s fyziologickou graviditou, zvýšené, při čem je tento rozdíl nejvíce přítomný u IgG. Koncentrace C3 složky komplementu je v PE vyšší, zatím co u

C4 je koncentrace nižší. Počet žen pozitivních na protilátky proti kardiolipinům typu IgM a IgG je, v porovnání s normálním těhotenstvím, větší. Taktéž, u žen s PE je větší procento inhibice migrace leukocytů, naznačující intenzitu buněčné imunity indukované antigeny trofoblastu<sup>34</sup>.

Dále se v 1. trimestru můžou sledovat sérové hladiny cytokinů, majících vliv na další průběh gravidity (interleukiny 6, 10, 15, 16, 18, TNF), a poté v dalším průběhu těhotenství můžou být sledovány markery oxidativního stresu<sup>33</sup>.

Oxidativní stres je možné definovat jako nerovnováhu mezi produkcí reaktivních kyslíkových radikálů a mírou jejich deaktivace antioxidanty. Normální placenta produkuje volné radikály, zároveň se však se zvyšujícím se počtem radikálů, zvyšuje i souhrnná kapacita antioxidantů (kyselina močová, vitamin C a vitamin E), takže celková rovnováha zůstává zachována. U preeklampsie dochází podle různých zdrojů<sup>6</sup> k dysbalanci se zvýšenou tvorbou peroxidových radikálů a následnou peroxidací lipidů a zvýšenou oxidací proteinů a DNA. Přirozená antioxidační schopnost organismu je přitom snížena a ve výsledku je placenta u preeklamptických pacientek v silném oxidativním stresu<sup>6</sup>.

Příčina oxidativního stresu zůstává neobjasněna, i když bylo publikováno několik navrhovaných mechanismů. Podle některých studií hodnota měřeného peroxidu vodíku koreluje s koncentrací hCG, a za preeklampsii může zvýšená apoptóza placentálních trofoblastů<sup>6</sup>.

Pro posouzení stupně oxidativního stresu lze použít celou řadu biochemických markerů. Ty jsou odvozeny od primárních endogenních antioxidačních enzymatických systémů (superoxiddismutasa, katalasa, systémy glutathionperoxidasa/reduktasa a enzymatické systémy využívající thioredoxin jako koenzym), ale i produktů oxidativního stresu. Dalšími ukazateli oxidativního stresu můžou být isoprostany, sloučeniny podobné prostaglandinům, produkované *in vivo* neenzymatickou radikálovou peroxidací arachidonové kyseliny. Další z markerů peroxidace lipidů je např. oxidovaný LDL anebo reaktivní sloučeniny thiobarbiturové kyseliny (TBARS)<sup>6</sup>.

### 1.1.3 Biochemie a příčiny preeklampsie

I když existuje mnoho studií a teorií o jejím vzniku, přesná příčina PE dodnes ještě není známá.

Jedna z teorií bere jako příčinu PE abnormální trofoblasty a mateřskou odpověď na placentaci.

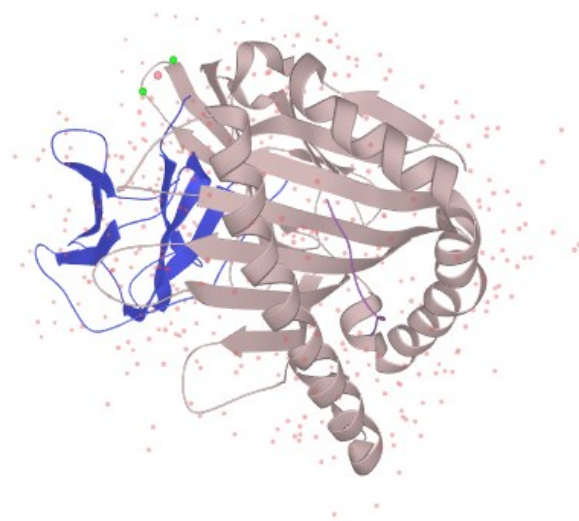
Implantace je složitý proces, který začíná adhezí embrya. V tomto kroku se uplatňují adhezivní molekuly jako jsou: E-kadherin, P-kadherin, konexiny a integriny. Následuje interakce buněk endometria a trofoblastu, kde je významná interakce NK buněk a HLA-G. Po překonání mucinové bariéry a průniku trofoblastu, za účasti štěpících enzymů (metaloproteinasy, kolagenasy, stromelysin, plazmin) a adhezních molekul (selektiny), dochází k proliferaci a syncytializaci trofoblastu za účasti růstových faktorů a cytokinů. Posledním krokem je decidualizace provázena intenzivní angiogenezí<sup>35</sup>.

Ze syncytiotrofoblastu vyrůstají výběžky (choriové klky), které se zanořují do hypertrofující děložní sliznice. Zbujelá děložní sliznice mezi blastocystou a děložní svalovinou se nazývá *decidua basalis* a jejím rozvojem a narůstáním choriových klků vzniká placenta. V tomto procesu sehrává významnou roli trofoblast, jež zajišťuje styčnou plochu mezi vajíčkem a sliznicí dělohy. Důležitou úlohu při kontaktu vajíčka se sliznicí dělohy mají trofoblastové buňky, jejichž povrchová výbava zajišťuje nízkou imunogennost a vysokou odolnost k matčině vypuzovací imunitní reakci<sup>35</sup>.

Preeklampsie je spojena s poruchou přeměny cytotrofoblastu do vaskulárních adhezí. Počáteční vaskulární změny pravděpodobně předcházejí endovaskulární trofoblastické invazi, která ukazuje, že intersticiální trofoblast a deciduální leukocyty (zejména NK buňky) hrají roli v časně disrupci. Tyto fyziologické změny vytváří arteriolární systém s nízkým odporem bez vazomotorické mateřské kontroly, který umožňuje podstatný vzestup krevního zásobení rostoucímu plodu. Tento počáteční fyziologický stupeň hypoxie je důležitý ve „switch“ mechanismu na produkci HIF-1- $\alpha$  s následným zvýšením tvorby některých angiogenních a růstových faktorů trofoblastem, včetně inzulinových růstových faktorů. Endovaskulární trofoblastická invaze představuje postranní cestu intersticiální invaze. Pravá decidua (děložní sliznice při těhotenství) je vytvořená jen u druhů s invazivní formou placentace. Člověk má extenzivní placentární invazi vzhledem k nutnosti dostatečně dlouhého intrauterinního období pro vývoj fetálního mozku<sup>36</sup>.

Hlavní buněčnou charakteristikou transformace sliznice endometria do deciduální podoby je masivní leukocytární infiltrace, tj. u těhotenství je vždy přítomná migrace neutrofilů do placenty (u PE je počet neutrofilů zvýšený)<sup>37</sup>. Proces začíná v luteální fázi před potenciální implantací. Během časně gravidity, uterinní NK buňky se nahromadí jako hustý infiltrát okolo invadujícího cytotrofoblastu. Od střední fáze gestace tyto buňky rychle mizí, což koinciduje s cytotrofoblastickou invazí do doby dokončení placentace okolo 20. týdne gestace. NK buňky ovlivňují nejen trofoblastickou invazi, ale i vaskulární změny v placentě schopností produkce cytokinů, které se projevují v angiogenezi a vaskulární stabilitě a zahrnují VEGF, PlGF a angiopoetin 2. Trofoblastická buněčná invaze do deciduy s její masivní leukocytární infiltrací představuje těsný tkáňový kontakt mezi allogenními buňkami<sup>36</sup>.

I když na syncytiotrofoblastu nejsou exprimovány klasické znaky HLA I. a II. třídy, místo toho invadující trofoblast exprimuje neklasické HLA-G a HLA-E antigeny. Nepolymorfní HLA-G (Obr. 3) je neklasická HLA molekula s typickou strukturou skládající se z těžkého řetězce a  $\beta$ -2-mikroglobulinu a hraje důležitou roli v ochraně trofoblastu před cytotoxickými účinky NK buněk. NK buňky na svém povrchu exprimují inhibiční receptory imunoglobulinové skupiny (KIR). Jejich inhibiční činnost je založena na asociaci s cytoplazmatickými fosfatázami, rušícími signalizační dráhy zahájené stimulačními receptory s vlastní proteinkinasovou aktivitou. O tom, zdali se NK buňka aktivuje či nikoliv, rozhoduje převaha buď stimulačních nebo inhibičních signálů<sup>35,36</sup>.



Obr.3. Struktura molekuly HLA-G. Převzato dle<sup>38</sup>.

Molekula HLA-G je důležitá pro aktivaci děložních přirozených zabíječů, ale je monomorfní a nemůže sdílet žádný partnersky specifický signál. Naopak HLA-C loky jsou dimorfní a tyto dvě HLA-C skupiny ovlivňují různé receptory NK buněk. U lidí existuje velká různorodost haplotypů KIR a protože HLA-C je polymorfní, každá gravidita bude mít různé kombinace paternálně odvozených HLA-C a mateřských receptorů KIR. Matky, kterým chybí aktivace většiny nebo všech KIR receptorů v případě, že plod exprimuje HLA-C2 molekuly, jsou ohroženy větším rizikem preeklampsie. Tento efekt se prokázal i tehdy, když matky měly HLA-C2 genotyp, což naznačovalo, že došlo k selhání rozlišení svého nebo i cizího antigenu.

Tato vazba mezi mateřskými KIR a trofoblastem nevykazuje známky typické imunologické reakce, ale je důkazem, že buňky z vrozeného imunního systému hrají fyziologickou roli ve vývoji placenty. Děložní NK buňky jsou během časných stadií gravidit zdrojem deciduálního IFN- $\gamma$ , který ovlivňuje přestavbu spirálních arterií a reguluje geny, stimuluje produkci  $\alpha$ -2-makroglobulinu, který prostřednictvím VEGF působí na vaskulární dilataci. Do procesu je zapojena i aktivita inducibilní NO-synthasy oxidu dusnatého. Hladiny IFN- $\gamma$ , který inhibuje migraci cytotrofoblastu v závislosti na počtu NK buněk, byly nalezeny zvýšené u preeklamptických gravidit<sup>36</sup>.

Taktéž se prokázalo, že preeklamptické matky vykazují zvýšené hladiny aktivovaných cirkulujících CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk, zvýšené zánětlivé cytokiny, včetně IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  a IL-17 a snížené hladiny protizánětlivých cytokinů, jako je IL-10. Také je zvýšená infiltrace CD4<sup>+</sup> T buněk v placentě a zvýšená prevalence zánětlivých mononukleárních buněčných lézí uvnitř vaskulárních stěn *deciduy*<sup>39</sup>.

Veškerá výše zmíněná fakta potvrzují teorii, že imunita může hrát hlavní roli při vzniku PE.

Další teorie vidí možnou příčinu v genetickém hledisku. Této teorii obzvláště napomáhá fakt, že je riziko PE větší u žen kde se PE vyskytuje v rodinné anamnéze.

Mnohé studie ukazují že určité lokusy na genech můžou být navázané s větším rizikem rozvoje PE. Podle jedné islandské studie může tuto vlastnost mít lokus 2p13 na chromozomu 2<sup>40,41</sup>. Podle finské studie, největší návaznost s rizikem PE mají lokusy 2p25 na chromozomu 2 a 9p13 na chromozomu 9<sup>40</sup>.

Další geny, které by mohly působit na výskyt PE jsou přítomné na chromozomu 1 (např. geny pro angiotenzinogen, faktor V nebo gen pro enzym methylenetetrahydrofolátreduktasu) a na chromozomu 6 (např. geny pro HLA a TNF)<sup>40</sup>.

Renin-angiotenzin-aldosteronový systém je velmi důležitý systém regulace homeostázy vody a elektrolytů. Klíčovou složkou tohoto systému je angiotenzin, jehož koncentrace přímo ovlivňuje krevní tlak a může tak zapříčinit vznik gestační hypertenze nebo PE<sup>42,43</sup>.

Další teorie ukazuje návaznost PE a některých angiogenních faktorů.

V průběhu těhotenství invazivní cytotrofoblasty pronikají stěnami spirálních tepen, kde nahrazují mateřský endotel, stimulují remodelaci arteriální stěny, což vede k dilataci arterií. Proces invaze cytotrofoblastů do spirálních tepen je doprovázen přechodem „epiteliální na endoteliální“ zahrnující angiogenní faktory, jejich receptory a faktory regulující kapilární funkci. Několik z těchto faktorů se podílí na patogenezi preeklampsie, jako jsou např. PlGF, VEGF-A, sFlt-1, TGF- $\beta$  a sENG<sup>44</sup>.

Změny hladin výše zmíněných faktorů (nárůst sFlt-1 a sENG, pokles PlGF a VEGF) poukazují na možnost jejich využití, jakožto biomarkerů předpovídajících riziko PE v těhotenství<sup>25,45</sup>.

Dráha fms-podobné tyrosinkinasy typu 1 (Flt-1) je v patogenezi PE ústřední, protože nadbytek cirkulující rozpustné Flt-1 v mateřské plazmě vede k charakteristickým klinickým projevům preeklampsie, včetně hypertenze a proteinurie. Podle některých studií za příčinou PE stojí právě chybná regulace loky pro Flt-1 v genomu plodu (respektive v placentě)<sup>46</sup>.

Flt-1 gen kóduje receptor 1 vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR1). Tento receptor se skládá ze sedmi imunoglobulinům podobných domén nacházejících se v extracelulární oblasti vázající ligand, transmembránového segmentu a cytoplazmatické oblasti obsahující doménu tyrosinkinasy. VEGFR1 se váže s VEGF a negativně reguluje jeho funkci, čím je velmi důležitý v procesu angiogeneze. Existuje několik isoform VEGFR1, jejichž rozpustné formy byly navázané s PE. Některé studie také prokázaly přítomnost různých genových variací Flt-1, při čem přítomnost určitých variací může snížit riziko PE<sup>47,48</sup>.

Některé studie ukázaly i na to, že za příčinou PE může být změna v rRNA (záměna adeninu za guanin) nebo že změna v DNA methylaci může ukázat na časnou PE<sup>49,50</sup>.

#### 1.1.4 Léčení

O léčbě PE se začíná mluvit až počátkem 20. století, do té doby se veškeré rady a postupy týkají pouze eklampsie. V první polovině 20. století se jako léčba PE doporučuje hospitalizace ženy, klidový režim a lehká dieta, která ženu nebude zbytečně zatěžovat (u závažného stavu se doporučuje hladovění). Zároveň bývala plošně navrhovaná léčba diuretiky, na rozdíl od současnosti, kdy se užívají výhradně při těžkých edémech – hlavně u edému plic či mozku. V druhé polovině 20. století se poprvé začíná mluvit o prevenci PE, tj. že PE lze předejít správnou životosprávou těhotné ženy. Ženám se tedy doporučuje přiměřený pohyb a výživa se sníženým obsahem bílkovin (nedoporučuje se zvěřina, uzeniny atd.). Léčba stále spočívá v klidovém režimu a dietě, a pro podporu diurézy se používají teplé zábaly a lázně. Jako diuretikum se podává acetylcholin a může se podávat i thiosíran sodný, který má povzbudivé účinky na parenchymatózní orgány – zejména játra, kterým navrácí schopnost zadržovat a zpracovávat glukózu. Z dalších léků se užívá síran hořečnatý ( $MgSO_4$ ), který má antikonvulzivní účinky, a slouží k zastavení progresu preeklampsie a jako prevence křečí. Pokud léčba nezabírá, doporučuje se ukončení těhotenství<sup>51</sup>.

V 21. století se jako prevence počítá dieta s více než 80 g bílkovin za den, minimální spotřeba soli a příjem tekutin více než dva litry za 24 hodin. Také se mluví o častém odpočinku ve vodorovné poloze a zejména na levém boku, aby byl usnadněn žilní návrat z dolní poloviny těla. Tato opatření snižují frekvenci výskytu preeklampsie. Samotná léčba pak spočívá v podávání hypertonik na snížení tlaku. Nejčastěji se podává dihydralazin a methyldopa, známý jako Dopegyt. Kromě toho se podávají sedativa ke zklidnění pacientky a zároveň ke snížení rizika vzniku křečí. Nadále se používá i síran hořečnatý, který se v minulosti často podával perorálně a dnes se podává intravenózně<sup>51</sup>.

Kromě methyldopy se nadále můžou podávat i kardioselektivní betablokátory nebo blokátory kalciových kanálů. Nedoporučuje se podávání diuretik, protože snižují placentární perfuzi a zvyšují riziko IUGR. Kontraindikovány jsou taktéž ACE inhibitory, blokátory receptorů pro angiotenzin II a chlorothiazidy<sup>23,52</sup>.

Princip léčby PE vždy spočívá v léčbě hypertenze, prevence křečí, vyrovnané bilanci tekutin a sledování celkového stavu matky a plodu. Možnosti léčby jsou velmi omezené, a tak jedinou kauzální léčbou zůstává včasné ukončení těhotenství<sup>16,23</sup>.

Jestliže se u těhotné rozvine těžký obraz PE (TK > 160/110, proteinurie 5 g za 24 hodin), je nutné zvážit ukončení těhotenství. Indikace ukončení těhotenství ze strany matky jsou např. oligurie < 400 ml za 24 hodin, iniciální prodromy eklampsie, vzestup jaterních enzymů, trombocytopenie, abrupce placenty, stoupající hladina kyseliny močové v séru či kreatininu atd. Indikace ukončení těhotenství ze strany plodu jsou známky IUGR plodu či známky ohrožení plodu – akutní nebo chronická hypoxie<sup>7,14</sup>.

V šestinedělí používáme obdobné skupiny léků jako v období těhotenství. Léčba při těžké formě preeklampsie musí být stejně intenzivní jako v těhotenství<sup>52</sup>.

### **1.1.5 Následky preeklampsie**

Všechny pacientky s gestační hypertenzí či preeklampií mají jednoznačně zvýšené riziko opakování hypertenze i preeklampsie v průběhu dalších těhotenství. Taktéž, během dalšího těhotenství je zvýšené riziko cévních komplikací.

Ženy s PE mají větší riziko родit menší děti a taktéž může dojít k předčasnému porodu, IUGR nebo abrupci placenty. Předčasný porod nastane u žen s těžkou preeklampií nebo eklampií až v 50 % případů<sup>53</sup>.

Celkové prospívání novorozence po porodu záleží vesměs na jeho porodní hmotnosti. Obecně platí pravidlo v čím nižším gestačním týdnu se dítě narodí, tím nižší má porodní hmotnost. Morbidita stoupá u dětí s porodní hmotností pod 1500 g a kritické hodnoty pod 1000 g jsou příčinou i nevyzpytatelné mortality. Děti jsou ohroženy především respiračními komplikacemi, infekcí a krvácením do CNS<sup>53</sup>.

Dalším rizikem pro děti po preeklampií se ukazují být vrozené vývojové vady srdce. Navzdory tomu že etiologie vrozených vývojových vad srdce není známá, mnohé studie prokázaly návaznost některých mateřských faktorů s vrozenými vývojovými vadami potomka. I když rozvoj PE nemůže být hlavním zapříčiněním vzniku srdeční vady plodu (vývoj srdce probíhá mnoho týdnů před objevením symptomů PE), byly objeveny společné rizikové faktory způsobující rozvoj mateřské PE a fetálních vrozených srdečních vad<sup>53</sup>.



Mnohé studie dokazují že PE má vliv i na pozdější život matky a nemoci, které se můžou objevit. Ženy, které v těhotenství prodělaly PE, mají v pozdějším životě zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních nemocí, cévní mozkové příchody, reverzibilní encefalopatie v zadní cirkulaci (PRES), onemocnění ledvin a jater<sup>53,54</sup>.

Pozdější vznik kardiovaskulárních nemocí může být navázaný se zvýšenou arteriální tuhostí zaznamenanou u žen které nedávno prodělaly PE<sup>55</sup>.

### **1.1.6 Těžká a poporodní preeklampsie**

O těžké PE hovoříme, pokud je tlak větší než 160/110 nebo je hodnota proteinurie je větší než 5 g za 24 hodin. Za těžkou formu bude PE označována i v případě přítomnosti oligurie < 400 ml za 24 hodin, epigastrické bolesti či bolesti v pravém hypochondriu, cefaley, nauzey, poruchy vidění, těžké bolesti hlavy a zvracení. Dále se můžou vyskytnout i trombocytopenie (< 100000  $\mu$ l), koncentrace kreatininu v séru větší než 1,1 mg/dl, plicní edém a cyanóza<sup>5,10,16</sup>.

Poporodní (postpartum) PE je vzácné, ale vážné onemocnění. Jedná se o stav, který má typické příznaky PE (vysoký krevní tlak a proteinurie), ale přitom se zjišťuje až po porodu (až 6 týdnů po porodu)<sup>56,58</sup>. Dosud není úplně jasné, zda se toto onemocnění skutečně objevilo až po porodu, a jakým způsobem by pak bylo zapříčiněno, nebo se spíše jedná o mylnou diagnózu v průběhu těhotenství (např. během celé gravidity měla pacientka diagnostikována gestační hypertenzi a až po porodu byla diagnóza překlasifikována na PE).

Tento stav se musí léčit stejně intenzivně jako PE v těhotenství, při nedodržení léčby může dojít k mrtvici, záchvatům, vážným poškození orgánů, a nakonec i k smrti ženy<sup>11,56</sup>.

## 1.2 Eklampsie

Eklampsie je stav, do kterého může preeklampsie přejít v případě, že není nasazena léčba při jejích klinických projevech nebo není proveden císařský řez při neúčinnosti léčby. Typickým projevem je nástup záchvatů ve formě prodromů, tonicko-klonických křečí a následného upadnutí do kómatu. Nemusí být přítomny veškeré fáze eklampsie, pacientka může upadnout do kómatu i rychle po vzestupu krevního tlaku. Tyto záchvaty se většinou objevují v čase porodu nebo v rozmezí do 24 hodin po porodu. Pokud se eklampsie neléčí, opakované záchvaty se stávají častějšími, trvají déle a v konečném důsledku mohou vést až k fatálním následkům<sup>57</sup>.

Podle některých zdrojů, eklampsie zasahuje 0,05 až 0,93 % žen, a je stále nejčastější příčinou úmrtí rodičky (v porovnání s PE)<sup>58,59</sup>.

Kauzální léčbou eklampsie je okamžité ukončení těhotenství bez ohledu na stáří těhotenství a vitalitu plodu, při současné stabilizaci základních vitálních funkcí pacientky<sup>52</sup>.

Pro léčbu křečí je lékem první volby síran hořečnatý, který se podává v den porodu a minimálně 24 hodin po porodu nebo po posledním záchvatu<sup>52,60</sup>.

Tato látka se podle mnoha studií ukázala jako nejúčinnější prevence opakujících se křečových záchvatů. Ženy, které přijímaly síran hořečnatý mělo 67 % menší riziko opakování křečí v porovnání se ženami které přijímaly fenytoin. Tyto ženy měly taktéž menší riziko vzniku zápalu plic, potřeby plicní ventilace nebo příjmu na jednotku intenzivní péče<sup>61,62</sup>. Dále se síran hořečnatý ukázal i jako účinnější než diazepam, kdy ženy přijímající síran hořečnatý měly 52 % menší riziko opakování křečí a zmenšilo se i riziko úmrtnosti matek<sup>62,63</sup>. Síran hořečnatý se ukázal i jako lepší volba než lytický koktail (většinou chlorpromazin, promethazin a petidin), s menším rizikem úmrtnosti matek, opakování křečí, a taktéž respirační depresí, kómatem nebo zápallem plic<sup>64</sup>.

Mechanismus účinku síranu hořečnatého není úplně známý, ale je pravděpodobně ovlivněn více faktory a zahrnuje jak vaskulární, tak neurologické mechanismy. Jako antagonistu vápníku může jeho účinek na hladké svalstvo cév hrát roli při snižování celkové periferní vaskulární rezistence. Kromě toho může mít účinek na mozkový endotel, aby omezil vazogenní edém snížením kontrakce vláknitých vláken a paracelulární permeability pomocí vápníkově závislých druhých messengerových

systemů, jako je MLC kinasa. Konečně, může také působit centrálně, aby inhiboval NMDA receptory, čímž poskytuje antikonvulzivní aktivitu zvýšením prahu záchvatu<sup>65</sup>.

Taktéž, bylo prokázáno, že terapie síranem hořečnatým snižuje hladiny sFlt-1, VEGFR-2, VEGFR-3 a sENG, a zvyšuje metabolity oxidu dusnatého. Předpokládá se, že vazodilatační účinek síranu hořečnatého a zvýšená produkce oxidu dusnatého zvyšuje průtok krve placentou a pomáhá výživě a vývoji plodu<sup>66</sup>.

### **1.3 Jiné patologie související s preeklampsií**

#### **1.3.1 Gestační hypertenze**

Arteriální hypertenze je definována hodnotami krevního tlaku rovnými nebo vyššími než 140/90, které jsou zjištěny opakovaně, tj. alespoň dvakrát při třech po sobě jdoucích měřeních. Gestační hypertenze je hypertenze bez přítomné proteinurie po dvacátém týdnu gravidity<sup>67</sup>.

Jestli je u těhotné ženy zjištěná hraniční hodnota tlaku, doporučuje se omezit fyzickou zátěž a pravidelně kontrolovat tlak. Při vyšších hodnotách tlaku se podávají stejná antihypertenziva jako u PE a hypertenze přítomné již před těhotenstvím. Při antihypertenzi terapií u akutního stavu se podávají léky působící na cévní stěnu (Nepresol), léky blokující současně  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\alpha_1$  receptory (Trandate) nebo diuretika Henleovy kličky. Při chronické terapií se podávají centrální alfa-agonisté (Dopegyt), kardioselektivní betablokátory (Vasocardin) nebo blokátory vápníkových kanálů<sup>67,68</sup>.

#### **1.3.2 Intrauterinní růstová retardace (IUGR)**

Jako růstovou retardací plodu označujeme opoždění růstu a vývoje plodu o 3–4 týdny podle ultrazvukové biometrie ve vztahu ke gestačnímu stáří stanovenému pomocí menstruačního cyklu a upřesněnému ultrazvukovým vyšetřením v prvním trimestru gravidity. Nitroděložní poruchy růstu jsou multifaktoriální, mohou být způsobeny faktory fetálními (chromozomální aberace plodu, infekce plodu, vrozené vývojové vady plodu), placentárními (např. infarkty placenty, abrupce, nádor placenty, pupečnickové anomálie) a mateřskými. Placentární faktory vznikají na podkladě patologické interakce mezi trofoblastem a deciduou. Mezi mateřské příčiny řadíme faktory genetické, rasové a nutriční. Dále sem patří závažná interní onemocnění matky jako chronická vaskulární onemocnění, renální poruchy, IDDM (inzulin dependentní *diabetes mellitus*), kolagenózy, trombofilie matky atd. Nemale roli při možném vzniku poruchy vývoje a růstu plodu hraje nadměrné užívání drog a léků, nepříznivá porodnická anamnéza,

profesionální i neprofesionální expozice škodlivin a samozřejmě kouření. I přes velké množství faktorů způsobujících IUGR je jeho přesná etiologie stále neznámá<sup>8</sup>.

I když se na první pohled může zdát, že se jedná o stejnou patologii, IUGR se výrazně liší od patologie malého plodu (SGA). SGA je definována jako porodní hmotnost menší než dvě standardní odchylky pod průměrem nebo menším než 10. percentil populačně specifické porodní hmotnosti pro specifický gestační věk<sup>69</sup>. Taktéž, IUGR se oproti SGA liší především placentární insuficiencí a patologickým uteroplacentárním průtokem krve<sup>7</sup>.

Růst plodu závisí na různých hormonech, hlavně na inzulínu, hormonech štítné žlázy, hormonech nadledvin a hormonech hypofýzy. Tyto hormony podporují růst a vývoj plodu a jakékoli narušení těchto hormonálních hladin vede k IUGR. Fetální inzulín funguje jako signál dostupnosti živin pro růst a nedostatek inzulínu povede k IUGR. Při nedostatku inzulínu dochází k IUGR kvůli sníženému příjmu a využití živin. V některých studiích bylo prokázáno, že pankreatická ageneze plodu vede k fetální hyperglykémii, což má za následek sekundární pokles gradientu koncentrace glukózy z matky na plod; dochází tedy ke snížení transportu glukózy k plodu, což vede k IUGR.

Glukokortikoidní hormon nemá žádné významné účinky na růst plodu, ale hraje důležitou roli ve vývoji a dozrávání fetálních orgánů. Tyto účinky zahrnují ukládání glykogenu, glukoneogenezi, oxidaci mastných kyselin, indukci produkce a uvolňování povrchově aktivních látek, strukturální maturaci alveol, strukturální maturaci gastrointestinálního traktu, zvýšenou expresi trávicích enzymů, zvýšenou funkci nadledvin, přechod z fetální na dospělé syntézu hemoglobinu a zrání brzlíku, jater a ledvin<sup>69</sup>.

PAPP-A je vylučován deciduou do mateřského oběhu a jeho nízké cirkulující hladiny v časném těhotenství byly spojeny se zvýšeným rizikem IUGR<sup>69</sup>. Podle některých studií, IUGR plody mají nižší hodnoty cirkulující VEGF (v porovnání se zdravými plody), což by mohlo sloužit jako biomarker tohoto stavu<sup>70</sup>.

Novorozenci IUGR mají různé typické znaky podvýživy: velká hlava ve srovnání se zbytkem těla, velká a široká přední *fontanella* (špatná tvorba membránových kostí), nepřítomný bukální tuk („vzhled starého muže“), malý obvod břicha, tenká pupeční šňůra, snížená kosterní svalová hmota a podkožní tuková tkáň, uvolněná, suchá a snadno odlupovatelná pleť, dlouhé nehty, relativně velké ruce a nohy ve srovnání s tělem, kůže s

volným záhybem kůže v zátylku na krku, axilii, mezipapulární oblasti a v oblasti gluteální tkáně (více než tři záhyby), nervózní a hyperaktivní dítě, špatná tvorba pupenů a nezralé ženské genitálie<sup>69</sup>.

Novorozenci IUGR po narození často mají komplikace jako jsou perinatální asfyxie, perzistující plicní hypertenze, hypotermie, hypoglykémie, hyperglykémie, hypokalcemie, polycytémie, žloutenka, potíže s krmením, potravinová intolerance, sepse pozdního nástupu, plicní hemoragie a další. V pozdějším věku se pak mohou rozvinout neurologické komplikace (problémy ve škole, problémy s chováním, menší síla, hyperaktivita, slabá vizuálně-motorická percepce atd.) a větší riziko určitých nemocí (kardiovaskulární nemoci, cukrovka typu 2, Alzheimerova choroba, deprese, osteoporóza atd.)<sup>69</sup>.

### 1.3.3 HELLP syndrom

Název HELLP syndrom se skládá z písmen, která označují: H-mikroangiopatická hemolytická anémie, EL-elevace jaterních enzymů a LP-snížený počet destiček<sup>71</sup>. Jedná se o další možnou komplikaci PE a multisystémovou poruchu charakterizovanou hemolýzou, zvýšenými jaterními enzymy a nízkým počtem destiček. Vyznačuje se vysokou mírou úmrtnosti a morbidoty, což vede k možným životu ohrožujícím komplikacím pro matku i plod<sup>72</sup>.

Rozlišení HELLP syndromu od ostatních komplikací v těhotenství je někdy velmi těžké, což může vést ke zpoždění léčby. U většiny pacientek s HELLP syndromem jsou přítomné hypertenze a proteinurie, a kromě toho, mohou být přítomné i bolest hlavy, zvracení, nauzea a epigastrická bolest nebo bolest v pravém hypogastriu s bolestí v pravé podklíčkové krajině (s propagací do zad). U závažného HELLP syndromu může dojít až k plicnímu edému, jaternímu a ledvinnému selhání, subkapsulárnímu hematomu, edému mozku a eklamptickému záchvatu<sup>71,73</sup>.

Etiologie tohoto onemocnění není úplně známá. Většina porodníků předpokládá, že se může jednat o poruchu imunity, tj. že HELLP pochází z autoimunitní reakce, která vede k mateřsko-fetální nerovnováze, s doprovodnou agregací krevních destiček, endoteliální poruchou a vrozenými chybami oxidačního metabolismu mastných kyselin<sup>71,72</sup>.

Jedinou kauzální léčbou, bezpečnou pro matku i plod, je včasný porod. Často diskutovaná je léčba kortikosteroidy, která u lehkých forem onemocnění zlepšuje

laboratorní ukazatele nemoci, ale přitom má kontroverzní výsledky z perinatologického hlediska<sup>71,73</sup>.

Některé studie dokázali že je u preeklamptických žen s HELLP syndromem zvýšená koncentrace plazmatického (ne placentárního) ceramidu-sfingolipid s antiangiogenními a proapoptotickými vlastnostmi<sup>74</sup>.

Této a jiné studie mohou v budoucnosti pomoci lepšímu porozumění a léčení HELLP syndromu.

## 1.4 Markery

Vědci se zabývají hledáním biomarkerů, které by dokázaly předpovědět PE s velkou přesností a dostatečně včas, ještě před projevem prvních klinických příznaků. Nejčastěji studované biomarkery v souvislosti s PE jsou PIGF, sFlt-1, PAPP-A a PP-13<sup>75,76</sup>.

Hlavní faktory regulující angiogenní homeostázu jsou, už vícekrát zmíněné, proangiogenní a antiangiogenní molekuly. Na jedné straně jsou to faktory, které podporují angiogenezi (produkovány jsou placentou a podílí se na normální proliferaci a nidaci trofoblastu): PIGF, VEGF a TGF- $\beta$ . Na druhé straně jsou opačně působící antiangiogenní faktory: sFlt-1 a sENG.

Změny jako jsou zvýšené hladiny sFlt-1, snížené hladiny PIGF a s tím související zvýšený poměr sFlt-1/PIGF jsou měřitelné v séru těhotných nejen s diagnostikovanou preeklampsií, ale i s IUGR či intrauterinním úmrtím plodu<sup>75</sup>.

PAPP-A je glykoprotein produkovaný rozvíjejícími se buňkami trofoblastu. Je odpovědný za štěpení proteinů vázajících růstový faktor podobný inzulinu (IGFBP-4), který reguluje placentární růst a vývoj plodu. Lze ho měřit v krvi těhotné ženy a jeho nízká hladina je spojena se zvýšeným rizikem Downova syndromu, mrtvorození, PE, IUGR a dalších chromozomálních abnormalit<sup>75,77</sup>.

PP-13 je galaktin syntetizovaný syncytiotrofoblastem a je velmi důležitým regulátorem imunity těhotenství. Má schopnost indukovat apoptózu aktivovaných T buněk in vitro a odvádět a usmrcovat T buňky a makrofágy v mateřských decidua in situ. Uvolňovaný je z placenty do mateřské cirkulace a detekovatelný je v séru matky, v séru plodu i v plodové vodě. Jedná se o dobrý biomarker, protože nízké koncentrace tohoto galaktinu v prvním trimestru těhotenství souvisely se zvýšeným rizikem PE<sup>75,78</sup>.

Jako další velmi dobré indikátory rozvoje gestační hypertenze, PE a eklampsie se ukázali  $\beta$ -hCG a sérový lipidový profil (významné zvýšení hladiny cholesterolu, triglyceridů a VLDL) v druhém trimestru<sup>79</sup>. Byly zkoumané i produkty pokročilé oxidace proteinů (AOPP), které vykazovali vyšší koncentrace u žen s PE než u netěhotných nebo nekomplikovaných těhotensví<sup>80</sup>.

#### **1.4.1 Protilátky proti kardiolipinům**

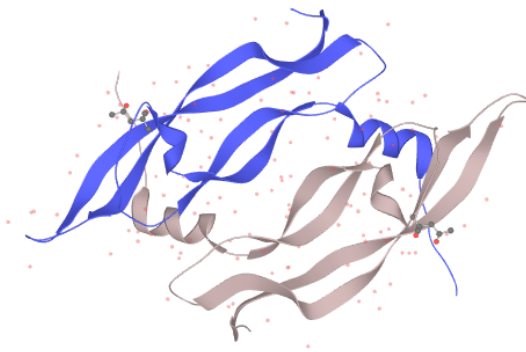
Přítomnost ACLA a APLA je spojována s řadou klinických poruch, včetně potratů, abrupce placenty, IUGR a PE. ACLA se vyšetřuje rutinně a popřípadě se vyšetření doplňuje o průkaz protilátek proti jiným fosfolipidům (fosfatidylserin, fosfatidylinositol, fosfatidylcholin a fosfatidyletanolamin). K detekci těchto protilátek slouží komerční ELISA souprava (přítomnost kofaktoru  $\beta_2$ -glykoproteinu)<sup>81,82</sup>.

Některé studie dokázaly přítomnost antikardiolipinových protilátek u žen s opakujícími se potraty, intrauterinní smrtí nebo novorozeneckou smrtí v anamnéze spojené s omezením růstu plodu, PE a abrupcí placenty. Celkový výskyt ACLA u těchto žen byl statisticky významně zvýšený ve srovnání s kontrolní skupinou. Nejvyšší pozitivní poměr byl zaznamenán u žen, které vykazovaly jak opakující se potrat, tak i intrauterinní smrt, nejnižší byl zaznamenán u žen s anamnézou novorozeneckých úmrtí. Zjištění této studie potvrzuje, že ACLA jsou silně spojeny se ztrátou plodu a že by přítomnost ACLA měla být testována u všech žen se špatným výsledkem těhotenství (před plánováním dalšího těhotenství)<sup>83,84</sup>.

Naopak, jiné studie neprokázaly zvýšené hodnoty ACLA u žen s PE, v porovnání s fyziologickým těhotenstvím. Tudíž, neprokázanou spojitostí mezi hladinami ACLA a PE, nepotvrdily potřebu rutinního vyšetření těchto protilátek<sup>85,86</sup>.

#### **1.4.2 Placentární růstový faktor**

PIGF patří do rodiny VEGF růstového faktoru a kóduje ho gen PGF. Jedná se o protein, čí podjednotku tvoří antiparalelní homodimer spojený disulfidovým můstkem. V některých případech může být podjednotka tvořena heterodimerem s VEGF<sup>87</sup>. Struktura tohoto proteinu je zobrazena na Obr.4.



Obr.4. **Struktura lidského placentárního růstového faktoru.** Převzato dle<sup>87</sup>.

Byly popsány čtyři isoformy pocházející z alternativního sestřihu genu PGF pro PIGF. Hlavní isoformy PIGF 1 a 2 byly spojeny se screeningem a diagnostikou PE. Protein PIGF 3 nebyl spojený s predikcí PE nebo SGA, avšak relativně vyšší množství PIGF 3 bylo nalezeno v placentární tkáni, kde je významně spojen s buněčnými membránami<sup>88</sup>.

Mnohé studie dokázaly že PIGF je dobrý možný prediktivní faktor pro PE. Jako užitečný nástroj pro diagnostiku PE se ukázal i poměr sFlt-1/PIGF.

### 1.4.3 Interleukiny

Interleukiny jsou skupina cytokinů (rozpuštěné glykoproteiny neimunoglobulinové povahy) které regulují imunitní reakce tím, že zajišťují komunikaci mezi leukocyty<sup>89</sup>. Existuje více popsaných interleukinů, které se mezi sebou liší buňkami, jimiž jsou produkovány a buňkami na které působí. Přitom se jejich působení vzájemně překrývají a doplňují.

Mnohé studie dokázaly, že by interleukiny mohly být dobré biomarkery a že by mohly nabídnout nahlédnutí do etiologie a patogeneze PE. U žen s PE byly naměřené zvýšené koncentrace IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 a zvýšená koncentrace TNF- $\alpha$ <sup>90,91,92</sup>.

Koncentrace IL-8 a TNF- $\alpha$  v mateřském séru a IL-6 a IL-8 v pupečníku plodu byly významně vyšší u pacientů se závažnou PE než u mírné PE. U pacientů s PE s IUGR byly tyto hladiny v mateřském séru taktéž vyšší než u pacientů s PE s normálním růstem plodu<sup>90</sup>.



## **2 Cíl práce**

Cílem mé bakalářské práce bylo vytvořit soubor poznatků o preeklampsii a poukázat na její problematiku.

Hlavním cílem experimentální části této práce bylo prozkoumat souvislost koncentrací annexinu V naměřených v prvním trimestru a rizika vzniku PE. Cílem práce bylo vyšetřit, jestli annexin V může být vhodný biomarker pro včasnou diagnózu PE.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

Souprava pro stanovení annexinu V:

- a) Pozitivní kontrola
- b) Negativní kontrola
- c) Standardy: 6,25 U/ml  
12,5 U/ml  
25,0 U/ml  
50,0 U/ml  
100,0 U/ml
- d) Promývací pufr (TRIS pufr, potřeba naředit s destilovanou vodou)
- e) Ředící pufr (fosfátový pufr)
- f) Konjugát („anti-human-IgGAM HRP conjugate“)
- g) Substrát (1,2 mmol/l 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin a 3 mmol/l peroxid vodíku)
- h) Terminační (STOP) roztok (0,5 mol/l kyseliny sírové)

#### 3.1.1 Vzorky

Vzorky krve byly odebrány standardním způsobem (intravenózně z periferní krve) do zkumavek pro srážlivou krev. Takto odebraná krev se nechá stát pár hodin (bez míchání nebo jakékoliv interakce), dokud se nevytvoří ve zkumavce vrstva sražené tmavé krve ve formě krevního koláče a žlutého krevního séra. Po uplynutí této doby se zkumavky s krví centrifugují na 1300 rpm 10 minut. Po centrifugaci se opatrně pipetou odebere horní vrstva séra do mikrozkušavek. Každá mikrozkušavka většinou obsahuje po 400 µl vzorku. Takto připravené vzorky v mikrozkušavkách se uloží do -80 °C.

## 3.2 Postup práce

Vybraná zpracovaná séra byla ponechána na laboratorní teplotě, aby se vytemperovali. ELISA přístroj bylo potřeba zapnout minimálně půl hodinu před měřením, aby se žárovka v něm zahřála na pracovní teplotu.

Promývací pufr (20x koncentrovaný) byl zředěný 1:19 s destilovanou vodou. Vytemperované vzorky byly taktéž zředěné, v poměru 1:100 s ředícím pufrem, tj. do 1 ml tohoto pufru bylo přidáno 10  $\mu$ l vzorku.

Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100  $\mu$ l standardů, pozitivní a negativní kontroly a 100  $\mu$ l každého ze vzorků. Jako srovnávací vzorek byl použit ředící pufr. Takto pipetovaná destička byla přikryta a ponechána 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Poté byl tento obsah vylit a destičku jsme 3x propláchli promývacím pufrem (pokaždé po 300  $\mu$ l). Po posledním propláchnutí jsme vylili promývací pufr a zbylý pufr jsme vyklepali do vrstvy buničiny. Poté bylo do všech jamek pipetováno 100  $\mu$ l konjugátu a ponecháno 30 minut.

Po inkubaci jsme destičku znovu 3x promyli stejným postupem. Pipetovali jsme 100  $\mu$ l substrátu a nechali inkubovat cca 10 minut.

Nakonec jsme do jamek přidali 100  $\mu$ l STOP roztoku a odečetli jsme absorbance při 450 nm.

Pro statistické zpracování a zjištění signifikantního rozdílu koncentrací annexinu V mezi skupinami (s patologií a s fyziologickou graviditou) byl použit Studentův t-test. Pro tento test byl použit vzorec:

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{S_{\bar{x}}^2 + S_{\bar{y}}^2 - 2I_{xy}S_{\bar{x}}S_{\bar{y}}}} \quad (1)$$

kde  $\bar{x}$  a  $\bar{y}$  jsou aritmetické průměry výběrových souborů a  $I_{xy}$  je korelační koeficient. Směrodatné odchylky hodnot  $\bar{x}$  a  $\bar{y}$  se vypočítali následovně:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S_x}{\sqrt{n_x}} \quad (2)$$

$$S_{\bar{y}} = \frac{S_y}{\sqrt{n_y}} \quad (3)$$

kde  $S_x$  a  $S_y$  jsou směrodatné odchylky výběrových souborů,  $n_x$  a  $n_y$  představují počet hodnot v dané skupině.

Pomocí funkcí CORREL, PRŮMĚR a SMODCH.VÝBĚR v programu Excel byl vypočten korelační koeficient  $I_{xy}$ , průměr a směrodatná odchylka pro obě skupiny.

Ve statistických tabulkách byla nalezena kritická hodnota  $t_{krit.}$  pro daný počet stupňů volnosti a pro danou hladinu významnosti<sup>93</sup>. Vypočítaná hodnota  $t$  a tabulková hodnota  $t_{krit.}$  byly následovně porovnány a tím bylo určeno či je rozdíl mezi kontrolní a preeklamptickou skupinou významný nebo nevýznamný.

### 3.3 Přístroje

Zkumavky

Mikrozkumavky Eppendorf 1,5 ml

Pipety Eppendorf Research Plus

Kádinky

Mikrotitrační destička (již s přítomnou vrstvou annexinu V)

Stolní centrifuga MPW-310 s výkyvným rotorem

## 4 Výsledky

Odebraná krev pacientek byla zpracována tak, jak je uvedeno v kapitole 3.1.1. Následovně byla vybraná séra použita pro ELISA test, tak jak je popsáno v kapitole 3.2. Výsledné naměřené hodnoty byly zapsány do tabulky (Tab.2.) pro obě měřené skupiny. Kromě naměřených koncentrací annexinu V, byly do tabulky přidány dané týdny gravidity, kdy byly vzorky krve odebrány.

Tab.2. Naměřené koncentrace annexinu V (pro fyziologické těhotenství i PE) s danými týdny gravidity, kdy bylo měření provedené.

Kontrolní skupina		Preeklamptická skupina	
Týden gravidity při odebrání vzorku	Koncentrace annexinu V (U/ml)	Týden gravidity při odebrání vzorku	Koncentrace annexinu V (U/ml)
7	13,9	9	15,5
7	33,6	8	30,7
9	10,2	8	16,6
8	13,2	10	44,7
10	39,5	10	20,1
9	22,1	11	26,8
9	28,7	10	17,8
10	15,2	10	33,6
10	18,9	9	35,9
11	30,0	13	29,6
8	19,5	9	25,9
10	30,7	12	39,1
7	26,3	12	11,3
10	14,9	10	20,6
8	13,0	9	14,9
7	25,8	11	21,8
		9	39,4
		10	16,0
		10	19,2
		10	4,70
		10	33,4
		10	13,0
		11	21,7
		13	68,6
		10	9,70
		10	7,00
		13	9,70

Pro obě dané skupiny (zapsaných v Tab.2.) byly pomocí programu Excel vypočítány průměr a směrodatná odchylka. Pro skupinu s PE byl vypočten korelační koeficient. Všechny této hodnoty jsou zapsané v Tab.3.

Tab.3. Průměr a směrodatná odchylka hodnot zapsaných v Tab.2. a korelační koeficient skupiny s patologií.

	Kontrolní skupina ( $x$ )	Skupina s PE ( $y$ )
Aritmetický průměr (U/ml)	22,2	24,0
Směrodatná odchylka (U/ml)	8,69	13,9
Korelační koeficient $I_{xy}$	/	0,0398

Po dosazení všech potřebných hodnot do rovnice (1), uvedené na str. 35 vychází hodnota  $t$  jako 0,533.

Ve statistických tabulkách byla nalezena kritická hodnota  $t_{krit.}$  pro 41 stupňů volnosti (celkem jsem měla 43 hodnot annexinu V) a pro hladinu významnosti 0,20. Vypočítaná hodnota  $t$  a tabulková hodnota  $t_{krit.}$  byly následovně porovnány.

$$t_{krit.} = 1,303 > t = 0,533$$

Hodnota  $t$  je menší než hodnota  $t_{krit.}$ . Proto není rozdíl mezi zkoumanými skupinami statisticky významný.

## 5 Diskuse

Preeklampsie je vážná porucha postihující těhotné ženy i nenarozené děti. Charakterizovaná je krevním tlakem vyšším než 140/90 a proteinurií (více než 300 mg za den). Kromě těchto projevů, můžou být přítomné i bolesti hlavy, nevolnost, problémy s viděním atd.<sup>4,11,14</sup>.

Navzdory závažnosti a mnohým studiím věnujícím se této poruše, její přesná příčina i nadále zůstává neznámá. Jistá je ale souvislost mezi touto patologií a chybnou funkcí placenty, která je vystavena hypoxií, což přináší komplikace pro matku i plod<sup>5,6</sup>.

Preeklampsie může vést k poškození jater a ledvin, mrtvici, hematologickým komplikacím, a dokonce i k smrti plodu<sup>24</sup>. Mnohé studie dokázaly že ženy, které v těhotenství prodělaly PE, mají v pozdějším životě větší riziko kardiovaskulárních nemocí. Děti po PE mají větší riziko, že budou mít vrozené vývojové vady srdce a mnohé studie ukazují i na mnoho dalších možných komplikací v pozdějším životě<sup>53,54</sup>.

PE můžou doprovázet IUGR a syndrom HELLP, nebo může PE přerůst do ještě těžšího stavu – eklampsie.

S ohledem na závažnost patologie, a ještě mnoho neznámých informací (přesná příčina a léčení), se snaží vědci najít vhodné biomarkery pro včasnou diagnózu. Tyto biomarkery by měly už v ranném stádiu těhotenství (první trimestr) předpovědět riziko vzniku PE. Největší problém u této patologie je právě ten, že se její klinické znaky a těžké stavy projevují až v pokročilejším těhotenství, když se už této nemoci nemůže předejít. Tento problém pak zvyšuje riziko celkového horšího průběhu a dopadu nemoci.

Nejčastější biomarkery spojované s PE jsou proangiogenní a antiangiogenní faktory. Změny těchto faktorů signifikantně prokazovaly souvislost s pozdějším výskytem PE<sup>26</sup>. Jako další dobré biomarkery se prokazují interleukiny a protilátky proti kardiolipinům (spojované i s potraty, abrupcí placent a patologií IUGR)<sup>81</sup>.

Annexin V je protein, který je často zkoumaný jako možný biomarker pro některé komplikace v těhotenství, např. potraty. Jeho návaznost s PE je ovšem sporná. Jeho koncentrace totiž na začátku těhotenství nevykazuje žádné signifikantní rozdíly mezi ženami, u kterých se později objeví PE a ženami, které tuto komplikaci v pozdějším těhotenství mít nebudou. Rozdíl mezi koncentrací protilátek annexinu V by byl

pravděpodobně podstatně významnější v pozdějších fázích těhotenství, kdy již dochází k rozvoji zánětu placenty<sup>94</sup>.

Jako jeden z příkladů návaznosti annexinu V a PE může být pacientka u které se v pozdějším těhotenství rozvinula těžká PE s TK 180/110 a vysokou proteinurií, otoky rukou a dolních končetin do výše lýtek. Této pacientce byla přitom v 13. týdnu gravidity naměřena koncentrace annexinu V 68,6 (Tab.2).

Statistická vyhodnocení klinických prací jsou zatížena tím, že každý pacient (každé těhotenství) je unikátní. Je velmi těžké a nepřesné brát všechny pacientky s PE do stejné skupiny, protože i když mají stejnou patologii, přece se rozlišují užíváním léků, týdnem gravidity, rozvojem (závažností) patologie atd.

Nepřesnost vyhodnocení může být způsobená i malým souborem pacientek a chybami při provedení ELISA testu.

Statistické vyhodnocení naměřených hodnot annexinu V bylo provedeno na hladině významnosti 0,20 což znamená že se pak dané výsledky mohou tvrdit z 80 %. Ani na tak nízké hladině významnosti však rozdíl mezi měřenými skupinami nebyl signifikantní.

I při zohlednění faktu, že při měření mohlo dojít k určitým chybám a že jsou klinické práce z určitého pohledu samy o sobě nepřesné, annexin V se stále vůbec neukázal být možným biomarkerem PE.



## **6 Souhrn**

Rozdíl mezi koncentracemi annexinu V mezi kontrolní a patologickou skupinou, měřený v prvním trimestru, není signifikantní. Annexin V se z našeho měření nejevil jako vhodný biomarker, který by mohl včasné naznačit počínající PE.

## 7 Seznam literatury

1. Štuksová, D.: Epidemiologie a vyhledávání rizikových skupin těhotných žen v prevenci těhotenských patologií. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta. MUDr. Petr Velebil, CSc. Praha 2008.
2. Lebl, J.: Růst a zrání dítěte. [on-line]. Fakultní nemocnice v Motole 2012. Dostupné z URL: <http://www.fnmotol.cz/kliniky-a-oddeleni/cast-pro-deti/pediatricka-klinika-uk-2-1f-a-fn-motol/pro-pacienty/informace-pro-pacienty/rust-a-zrani-ditete/> [cit.15.2.2020]
3. Cuffe, J.S.M.; Holland, O.; Salomon C.; Rice, G.E.; Perkins, A.V.: Review: Placental Derived Biomarkers of Pregnancy Disorders. *Placenta*. **54** (2017).
4. Preeclampsia foundation: *About preeclampsia*. [on-line], 2019. Dostupné z URL: <https://www.preeclampsia.org/health-information/about-preeclampsia?fbclid=IwAR2iUeMCoFEe9JSiEXm4TigAx6Uq3rzKZQS7E8QOI5MmGZ03GRyWA0VB7mU> [cit.24.1.2020]
5. Rana, S.; Lemoine, E.; Granger, J.P.; Karumanchi, S.A.: Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res*. **24**:7 (2019).
6. Arnoštová, L.; Fialová, L.; Malbohan, I.; Zima, T.; Springer, D: Preeklampsie a její diagnostika. *Klin.Biochem.Metab.* **15**:36 (2007).
7. Hájek, Z.; Andělová, K.; Binder, T.; Calda, P.; Čepický, P.; Drbohlav, P.; Mára, M.; Mašata, J.; Měchurová, A.; Pařízek, A.; Roztočil, A.; Štembera, Z.; Velebil, P.; Větr, M.; Žižka, Z.: *Rizikové a patologické těhotenství*. Praha, Grada publishing, 2004.
8. Dostálová, Z.; Gerychová, R.: Rizika těhotenství a porodu. *Interní Med.* **10**:9 (2008).
9. Klozová, R.: *Preeklampsie a eklampsie*. [on-line]. Dostupné z URL: <https://www.ipvz.cz/vzdelavaci-akce/dokumenty/11135-prim-klozova-preeklampsie-a-eklampsie.pdf> [cit.24.1.2020]
10. Novotná, J.: Hypertenze v těhotenství. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta zdravotnických věd. Doc. MUDr. Martin Procházka, Ph.D. Olomouc 2013.
11. Wick, M.J.: *Mayo clinic guide to a healthy pregnancy*. 2nd ed., New York, RosettaBooks LLC, 2018.

12. Kříž, P.: *Preeklampsie, eklampsie, HELLP syndrom - anesteziologický postup*. [on-line]. Dostupné z URL:

<https://www.csarim.cz/content/uploads/2018/11/anesteziologicky-postup-pri-preklampsii-eklampsii-a-hellp-syndromu.pdf> [cit.26.1.2020]

13. Mayrink, J.; Costa, M.L.; Cecatti, J.G.: Preeclampsia in 2018: Revisiting Concepts, Physiopathology, and Prediction. *ScientificWorldJournal*. **2018**:6268276 (2018).

14. Marešová, P.: Ošetrovatelská kazuistika u pacientky po akutním císařském řezu ve 27. týdnu gravidity s indikací preeklampsie. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Mgr. Miluše Kulhavá. Praha 2009.

15. Viklický, O. a kol.: *Doporučené postupy a algoritmy v nefrologii*. Praha, Grada publishing, 2010.

16. Měchurová, A.: Hypertenze v graviditě. *Moderní babičtví*. **2** (2003).

17. Moravcová, L.: Vývoj metody pro stanovení albuminu v moči pomocí HPLC. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta. Ing. Eva Klapková, Ph.D. Praha 2011.

18. Chemická analýza moči [on-line].

Dostupné z URL: <http://orion.chemi.muni.cz/michaw/vyuka/uloha1.htm> [cit.3.2.2020]

19. Tesař, V.; Zima, T.; Racek, J.; Teplan, V.; Friedecký, B.; Kratochvíla, J.; Granátová, J.; Kubíček, Z.: *Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování proteinurie*. [on-line]. Praha, 2010. Dostupné z URL: <http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/dop-proteinurie.pdf> [cit.3.2.2020]

20. Štern, P.: *Stanovení celkového proteinu v moči*. [on-line]. Sekk, s.r.o. 2010. Dostupné z URL: <http://www.demo4.smitka.eu/encyklopedie/A/STACF.htm> [cit.3.2.2020]

21. Morikawa, M.; Mayama, M.; Saito, Y.; Nakagawa-Akabane, K.; Umazume, T.; Chiba, K.; Kawaguchi, S.; Cho, K.; Watari, H.: Severe Proteinuria as a Parameter of Worse Perinatal/Neonatal Outcomes in Women With Preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. **19** (2020).

22. Bejjani, L.; Nedellec, S.; Taïeb, J.; Thervet, E.; Benachi, A.: Spot urinary protein to creatinine ratio: Which role in preeclampsia diagnosis?. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. **44**:9 (2015).
23. Binder, T.; Horák, J.; Mrštinová, M.; Klozová, R.; Špálová, I.; Vavřínková, B.; Vlk, R.: *Porodnictví*. Praha, Karolinum, 2011.
24. Fox, R.; Kitt, J.; Leeson, P.; Aye, C.Y.L.; Lewandowski, A.J.: Preeclampsia: Risk Factors, Diagnosis, Management, and the Cardiovascular Impact on the Offspring. *J Clin Med*. **8**:10 (2019).
25. Bisták, P.: Screening preeklampsie – pravda nebo fikce?. *Actual Gyn*. **9** (2017).
26. Springer, D.: Zkušenosti s vyšetřením markerů preeklampsie v krvi těhotných žen. *Labor Aktuell*. **3** (2017).
27. Rana, S.; Karumanchi, S.A.; Levine, R.J.; Venkatesha, S.; Rauh-Hain, J.A.; Tamez, H.; Thadhani, R.: Sequential Changes in Antiangiogenic Factors in Early Pregnancy and Risk of Developing Preeclampsia. *Hypertension*. **50**:1 (2007).
28. O’Gorman, N.; Wright, D.; Syngelaki, A.; Akolekar, R.; Wright, A.; Poon, L.C.; Nicolaides, K.H.: Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 11–13 weeks gestation. *Am J Obstet Gynecol*. **214**:1 (2016).
29. Gallo, D.M.; Wright, D.; Casanova, C.; Campanero, M.; Nicolaides, K.H.: Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 19–24 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*. **214**:5 (2016).
30. Poon, L.C.Y.: Early Prediction of Preeclampsia. *Obstet Gynecol Int*. **2014**: 297397 (2014).
31. Tsiakkas, A.M.D.; Saiid, Y.; Wright, A.; Wright, D.; Nicolaides, K.H.: Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal factors and biomarkers at 30–34 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*. **215**:1 (2016).
32. Andrietti, S.; Silva, M.; Wright, A.; Wright D.; Nicolaides, K.H.: Competing-risks model in screening for pre-eclampsia by maternal factors and biomarkers at 35–37 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. **48**:1 (2016).

33. Kestlerová, A.; Krofta, L.; Žufić, A.; Hamplová Běhávková, K.; Račko, J.; Beneš, J.; Feyereisl, J.: Laboratory Options for Risk Assessment of Pregnancy Pathologies. *Physiol Res.* **68**:4 (2019).
34. Kestlerová, A.; Feyereisl, J.; Frisová, V.; Měchurová, A.; Šůla, K.; Zima, T.; Běláček, J.; Madar, J.: Immunological and biochemical markers in preeclampsia. Praha.
35. Červenková, B.: Možnosti vyšetření buněčné imunity u infertilních žen. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. PharmDr. Petr Jílek, CSc. Hradec Králové 2012.
36. Hradecký, L.: Preeklampsie a některé její imunogenetické faktory. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni. Prof. MUDr. Zdeňka Ulčová-Gallová, DrSc. Plzeň 2010.
37. Miková, E.: Role neutrofilů u preeklampsie. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D. Praha 2019.
38. UniProt: HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain G. [on-line]. Dostupné z URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P17693>. [cit.10.2.2020]. Kód: P17693.
39. Jafri, S.; Ormiston, M.L.: Immune regulation of systemic hypertension, pulmonary arterial hypertension, and preeclampsia: shared disease mechanisms and translational opportunities. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **313**:6 (2017).
40. Laivuori, H.; Lahermo, P.; Ollikainen, V.; Widen, E.; Häivä-Mällinen, L.; Sundström, H.; Laitinen, T.; Kaaja, R.; Ylikorkala, O.; Kere, J.: Susceptibility Loci for Preeclampsia on Chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish Families. *Am J Hum Genet.* **72**:1 (2003).
41. Arngrímsson, R.; Sigurðardóttir, S.; Frigge, M.L.; Bjarnadóttir, R.I.; Jónsson, T.; Stefánsson, H.; Baldursdóttir, A.; Einarsdóttir, A.S.; Palsson, B.; Snorradóttir, S.; Lachmeijer, A.M.; Nicolae, D.; Kong, A.; Bragason, B.T.; Gulcher, J.R.; Geirsson, R.T.; Stefánsson, K.: A Genome-Wide Scan Reveals a Maternal Susceptibility Locus for Pre-Eclampsia on Chromosome 2p13. *Hum Mol Genet.* **8**:9 (1999).
42. Caulfield, M.; Lavender, P.; Farrall, M.; Munroe, P.; Lawson, M.; Turner, P.; Clark, A.J.: Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med.* **330**:23 (1994).

43. Lumbers, E.R.; Delforce, S.J.; Arthurs, A.L.; Pringle, K.G.: Causes and Consequences of the Dysregulated Maternal Renin-Angiotensin System in Preeclampsia. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **10**:563 (2019).
44. Jebbink, J.; Wolters, A.; Fernando, F.; Afink, G.; Van der Post, J.; Ris-Stalpers, C.: Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome — A review. *Biochim Biophys Acta*. **1822**:12 (2012).
45. Zhao, W.; Qiao, J.; Zhang, Q.; Zhao, Y.; Chen, Q.: Levels of antiangiogenic factors in preeclamptic pregnancies. *Growth Factors*. **28**:4 (2010).
46. Gray, K.J.; Saxena, R.; Karumanchi, S.A.: Genetic predisposition to preeclampsia is conferred by fetal DNA variants near FLT1, a gene involved in the regulation of angiogenesis. *Am J Obstet Gynecol*. **218**:2 (2018).
47. GeneCards: FLT1 Gene. [on-line]. Dostupné z URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLT1>. [cit.13.2.2020]
48. Lokki, A.I.; Daly, E.; Triebwasser, M.; Kurki, M.I.; Roberson, E.D.O.; Häppölä, P.; Auro, K.; Perola, M.; Heinonen, S.; Kajantie, E.; Kere, J.; Kivinen, K.; Pouta, A.; Salmon, J.E.; Meri, S.; Daly, M.; Atkinson, J.P.; Laivuori, H.: Protective low frequency variants for preeclampsia in the FLT1 gene in the finnish population. *Hypertension*. **70**:2 (2017).
49. Folgerø, T.; Storbakk, N.; Torbergesen, T.; Oian, P.: Mutations in mitochondrial transfer ribonucleic acid genes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. **174**:5 (1996).
50. Van den Berg, C.B.; Herzog, E.M.; Duvkot, J.J.; Van der Spek, P.J.; Steegers, E.A.P.; Stoop, M.P.; Willemsen, S.P.; Steegers-Theunissen, R.P.M.: Differences in DNA methylation of insulin-like growth factor 2 and cadherin 13 in patients with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. **19** (2020).
51. Bilas, M.: Preeklampsie. Bakalářská práce. Fakulta zdravotnických studií. Mgr. Lucie Kašová. Plzeň 2015.
52. Vlk, R.; Procházka, M.: Hypertenzní onemocnění v těhotenství. *Čes. Gynek*. **83**:2 (2018).
53. Gibiecová, D.: Dlouhodobé následky preeklampsie. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta zdravotnických věd. prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D. Olomouc 2016.

54. Pankiewicz, K.; Szczerba, E.; Maciejewski, T.; Fijałkowska, A.: Non-obstetric complications in preeclampsia. *Prz Menopauzalny*. **18**:2 (2019).
55. Usselman, C.W.; Adler, T.E.; Coovadia, Y.; Leone, C.; Paidas, M.J.; Stachenfeld, N.S.: A recent history of preeclampsia is associated with elevated central pulse wave velocity and muscle sympathetic outflow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **318**:3 (2020).
56. Preeclampsia foundation: *Postpartum Preeclampsia: Moms are Still at Risk After Delivery* [on-line], 2018. Dostępne z URL: <https://www.preeclampsia.org/stillatrisk>. [cit.17.2.2020]
57. Moore, T.R.: Hypertensive Complications of Pregnancy. V *Avery's Diseases of the Newborn* (Gleason, C.A.; Juul, S.E., ed.). 10th ed., Elsevier, 2018, s.119–125.
58. McDonald, S.M.; Malinowski, A.; Zhou, Q.; Yusuf, S.; Devereaux, P.J.: Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: A systematic review and meta-analyses. *Am Heart J*. **156**:5 (2008).
59. Duley, L.: The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Semin Perinatol*. **33**:3 (2009).
60. Collange, O.; Launoy, A.; Kopf-Pottecher, A.; Dietemann, J.-L.; Pottecher, T.: [Eclampsia]. *Ann Fr Anesth Reanim*. **29**:4 (2010).
61. Duley, L.; Henderson-Smart, D.J.; Chou, D.: Magnesium sulphate versus phenytoin for eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev*. **10** (2010).
62. The Eclampsia Trial Collaborative Group: Which anticonvulsant for women with eclampsia? Evidence from the Collaborative Eclampsia Trial. *The Lancet*. **345**:8963 (1995).
63. Duley, L.; Henderson-Smart, D.J.; Walker, G.J.; Chou, D.: Magnesium sulphate versus diazepam for eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev*. **2010**:12 (2010).
64. Duley, L.; Gülmezoglu, A.M.; Chou, D.: Magnesium sulphate versus lytic cocktail for eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev*. **2010**:9 (2010).
65. Euser, A.G.; Cipolla, M.J.: Magnesium Sulfate for the Treatment of Eclampsia. *Stroke*. **40**:4 (2009).

66. Korish, A.A.: Magnesium sulfate therapy of preeclampsia: an old tool with new mechanism of action and prospect in management and prophylaxis. *Hypertens Res.* **35**:10 (2012).
67. Měchurová, A.; Andělová, K.: Hypertenze v graviditě – doporučený postup. *Čes. Gynek.* (2013).
68. Weinberger, V.; Janků, P.: *Hypertenze v těhotenství*. [on-line] Praha, 2008.
- Dostupné z URL: <https://www.slideserve.com/ebony-grimes/hypertenze-v-t-hotenstv> [cit.21.2.2020]
69. Sharma, D.; Shastri, S.; Sharma, P.: Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr.* **10** (2016).
70. Eke, A.C.; Everett, A.; Northington, F.; Vaidya, D.; McClarin, L.; Graham, E.M.: 178: Identification of intrauterine growth restriction (IUGR) via biomarkers in cord blood and neonatal serum. *Am J Obstet Gynecol.* **220**:1 (2019).
71. Seidlová, D.: Akutní stavy v porodnictví. [on-line]. Dostupné z URL: <https://www.akutne.cz/res/publikace/akutni-stavy-v-porodnictvi-seidlova-d.pdf> [cit.21.2.2020]
72. Aloizos, S.; Seretis, C.; Liakos, N.; Aravosita, P.; Mystakelli, C.; Kanna, E.; Gourgiotis, S.: HELLP syndrome: understanding and management of a pregnancy-specific disease. *J Obstet Gynaecol.* **33**:4 (2013).
73. Wallace, K.; Harris, S.; Addison, A.; Bean, C.: HELLP Syndrome: Pathophysiology and Current Therapies. *Curr Pharm Biotechnol.* **19**:10 (2018).
74. Amraoui, F.; Lahsinoui, H.H.; Spijkers, L.J.A.; Vogt, L.; Peters, S.L.M.; Wijesinghe, D.S.; Warncke, U.O.; Chalfant, C.E.; Ris-Stalpers, C.; Van den Born, B.-J.H.; Afink, G.B.: Plasma ceramide is increased and associated with proteinuria in women with pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Pregnancy Hypertens.* **19** (2020).
75. Beránková, H.: Využití biomarkerů pro diagnostiku a prevenci preeklampsie a eklampsie. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D. Rychnov nad Kněžnou 2017.



76. Sunjaya, A.F.; Sunjaya, A.P.: Evaluation of Serum Biomarkers and Other Diagnostic Modalities for Early Diagnosis of Preeclampsia. *J Family Reprod Health*. **13**:2 (2019).
77. Carter, W.: *Pregnancy A to Z*. Medwords, 2011.
78. Than, N.G.; Balogh, A.; Romero, R.; Kárpáti, E.; Erez, O.; Szilágyi, A.; Kovalszky, I.; Sammar, M.; Gizurarson, S.; Matkó, J.; Závodszy, P.; Papp, Z.; Meiri, H.: Placental Protein 13 (PP13) – A Placental Immunoregulatory Galectin Protecting Pregnancy. *Front Immunol*. **5**:348 (2014).
79. Murmu, S.; Dwivedi, J.: Second-Trimester Maternal Serum Beta-Human Chorionic Gonadotropin and Lipid Profile as a Predictor of Gestational Hypertension, Preeclampsia, and Eclampsia: A Prospective Observational Study. *Int J Appl Basic Med Res*. **10**:1 (2020).
80. Fialová, L.; Kalousová, M.; Soukupová, J.; Malbohan, I.; Madar, J.; Frisová, V.; Stípek, S.; Zima, T.: Markers of inflammation in preeclampsia. *Prague Med Rep*. **105**:3 (2004).
81. Fialová, L.; Mikulíková, L.; Matous-Malbohan, I.; Benesová, O.; Zwinger, A.: Prevalence of various antiphospholipid antibodies in pregnant women. *Physiol Res*. **49**:3 (2000).
82. Hrdá, P.; Šterzl, I.: Vyšetření autoprotilátek – současné možnosti. *Interní Med*. **5**:8 (2003).
83. De Carolis, S.; Caruso, A.; Ferrazzani, S.; Carducci, B.; De Santis, L.; Mancuso, S.: Poor Pregnancy Outcome and Anticardiolipin Antibodies. *Fetal Diagn Ther*. **9**:5 (1994).
84. Do Prado, A.; Piovesan, D.M.; Staub, H.L.; Horta, B.L.: Association of Anticardiolipin Antibodies With Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obstet Gynecol*. **116**:6 (2010).
85. Lee, R.M.; Brown, M.A.; Branch, D.W.; Ward, K.; Silver, R.M.: Anticardiolipin and anti- $\beta_2$ -glycoprotein-I antibodies in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. **102**:2 (2003).
86. D'Anna, R.; Scilipoti, A.; Leonardi, J.; Scuderi, M.; Jasonni, V.M.; Leonardi, R.: Anticardiolipin antibodies in pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Clin Exp Obstet Gynecol*. **24**:3 (1997).

87. UniProt: Placenta growth factor. [on-line]. Dostupné z URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P49763>. [cit.25.2.2020]. Kód: P49763.
88. Frang, H.; Hurskainen, P.; Nicolaides, K.; Sairanen, M.: PlGF isoform 3 in maternal serum and placental tissue. *Pregnancy Hypertens.* **18** (2019).
89. Ferenčík, M.; Rovenský, J.; Shoenfeld, Y.; Mařha, V.: *Imunitní systém: informace pro každého*. Praha, Grada publishing, 2005.
90. Tosun, M.; Celik, H.; Avci, B.; Yavuz, E.; Alper, T.; Malatyalioglu, E.: Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* **23**:8 (2010).
91. Lau, S.Y.; Guild, S.-J.; Barrett, C.J.; Chen, Q.; McCowan, L.; Jordan, V.; Chamley, L.W.: Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-10 Levels are Altered in Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Reprod Immunol.* **70**:5 (2013).
92. Rinehart, B.K.; Terrone, D.A.; Lagoo-Deenadayalan, S.; Barber, W.H.; Hale, E.A.; Martin Jr., J.N.; Bennett, W.A.: Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin  $1\beta$ , and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* **181**:4 (1999).
93. Šmelko, Š.: *Štatistické metody v lesníctve*. Zvolen, Vysoká Škola Lesnícka a Drevárska, 1963.
94. Dle ústního sdělení Ing. Andrey Kestlerové (AREPIM s.r.o.) dne 6. června 2020.