

Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Gynekologicko-porodnická klinika Fakultní nemocnice v Plzni

Preeklampsie a některé její imunogenetické faktory

Plzeň 2010

Autoreferát dizertační práce k získání akademického titulu Ph. D.

Vědní obor: Gynekologie a porodnictví

MUDr. Libor Hradecký



Doktorská dizertační práce byla vypracována v rámci externí formy doktorandského studijního programu na Gynekologicko-porodnické klinice Fakultní nemocnice v Plzni, Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

Uchazeč: MUDr. Libor Hradecký

Gynekologicko-porodnická klinika Fakultní nemocnice v Plzni, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

Školitel: Prof. MUDr. Zdeňka Ulčová-Gallová, DrSc.

Gynekologicko-porodnická klinika Fakultní nemocnice v Plzni, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

Oponenti:

1.

2.

Stanovisko k doktorské dizertační práci bylo vypracováno na Gynekologicko-porodnické klinice Fakultní nemocnice v Plzni, Lékařské fakulty v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

Přednosta: Doc. MUDr. Zdeněk Novotný, CSc.

Autoreferát byl rozeslán dne.....

Obhajoba dizertační práce se koná dne 2011 v..... hod.. před komisí pro obhajoby dizertačních prací doktorského studijního programu v oboru gynekologie a porodnictví v Plzni, Seminární místnost Gynekologicko-porodnické kliniky FN Plzeň, Alej Svobody 80, 3. patro.

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu lékařské fakulty v Plzni, Husova 3.

Předseda komise pro obhajoby v oboru gynekologie a porodnictví:

Doc. MUDr. Zdeněk Novotný, CSc.

Obsah

1 Úvod.....	1
1.1 Definice preeklampsie	1
1.2 Epidemiologie a rizikové faktory preeklampsie.....	1
1.3 Etiopatogeneze preeklampsie.....	1
2 Cíl práce.....	4
3 Materiál a metodika	4
3.1 Soubor.....	4
3.2 Protokol studie	5
3.3 Metodika studie.....	5
3.3.1 Metodika stanovení hladin antifosfolipidových protilátek	5
3.3.2 Metodika stanovení trombofilních stavů	7
3.4 Statistika	8
4 Výsledky.....	8
4.1 Výsledky vyšetření jednotlivých antifosfolipidových protilátek.....	10
4.2 Korelační analýza.....	12
4.3 Vyšetření trombofilních stavů.....	13
5 Diskuze	14
6 Závěry.....	16
6.1 Závěry vyšetření antifosfolipidových protilátek	16
6.2 Závěry výsledků trombofilních stavů.....	17
7 Souhrn	17
8 Summary.....	18
9 Literatura	19
10 Publikační činnost autora.....	23
10.1 Články v časopisech.....	23
10.2 Postery	24
10.3 Přednášky.....	24

Seznam zkratek:

ACLA	antikardiolipinové protilátky
APA	antifosfolipidové protilátky
APS	antifosfolipidový syndrom
AT	antitrombin
AT1	angiotensinový receptor
BMI	body mass index
β2 GPI	β 2 glykoprotein I
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylen-diaminotetraoctová
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
F	faktor
sFlt-1	solubilní fms-like tyrozinkináza-1
FVL	Leidenská mutace FV
hCG	lidský choriový gonadotropin.
HELLP	„hemolysis - elevated liver enzymes - low platelet count“
HIV	virus získaného lidského imunodeficitu (human imunodeficiency virus)
HLA	histokompatibilní leukocytární antigen
HBsAg	antigen proti povrchovému viru hepatitidy B –(Hepatitis B Surface Antigen)
IFN γ	interferon gamma
Ig	imunoglobulin
IUGR	intrauterinní růstová retardace
IVF	in vitro fertilizace
KIR	killer imunoglobulin-like receptor
MTHFR	methylen-tetrahydrofolát-reduktáza
N	počet (number)
NK	natural killers- přirození zabíječi
OS	oxidativní stress
OR	odds ratio
PAMP	molekulární znaky patogenů (PAMP= pathogen associated molecular pattern)
PIGF	placentární růstový faktor
TGF	transformující růstový faktor
TLR	Toll like receptory
TK	krvní tlak
TNF	tumorózní nekrotizující faktor
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor

Preeklampsie a některé její imunogenetické faktory

1 Úvod

1.1 Definice preeklampsie

Preeklampsie (PE) je charakterizována multiorgánovým postižením, vznikajícím na podkladě generalizované vazokonstrikce s orgánovou hypoperfúzí, na kterém se podílí porucha koagulačního systému s tvorbou fibrinových depozit a poškozením endotelu, které vede k syndromu úniku bílkovin, hypovolémií a tvorbě edémů. Všechny současné definice však vycházejí z konsenzu, nikoli z komplexního pochopení patogeneze choroby. Klinicky se PE projevuje klasickou trias: gestační hypertenze, proteinurie, edém, ale liší se případ od případu dobou vzniku, rychlostí progresu, stupněm ohrožení matky a plodu a mírou poškození mateřského organismu.

1.2 Epidemiologie a rizikové faktory preeklampsie

Preeklampsie postihuje 2-7 % gravidit. Pro PE existuje množství rizikových faktorů včetně imunologických, ke kterým řadíme např. omezenou expozici partnerskými spermii před koncepcí (1-3). Protektivní vliv dlouhodobé expozice spermatem téhož partnera by mohl vysvětlit vysoké riziko preeklampsie u žen mladších 20- ti let. Předchozí spontánní nebo indukovaný abort či fyziologické těhotenství se stejným partnerem je spojeno se sníženým rizikem PE. Tento protektivní efekt se ztrácí se změnou partnera v další graviditě (2,3). Je definován tzv. rizikový muž, který může vyvolat PE i u těhotenství s jinými partnery. K nárůstu rizik PE přispívají techniky asistované reprodukce s použitím darovaných gamet, které ovlivňují mateřsko fetální imunitní interakci a často mají za následek mnohočetnou graviditu, další rizikový faktor PE. Na vzniku PE se podílí obezita, prováděná inzulinovou rezistencí, dyslipidemií a hypertenzí (3,6).

1.3 Etiopatogeneze preeklampsie

Imunologická teorie etiopatogeneze PE podporuje koncept mateřsko - fetální (paternální) imunologické maladaptace (2,3,5). Opakovaný sexuální styk s mnohočetnou expozicí antigeny z buněk spermií ve správném cytokinovém prostředí je podstatou partnersky specifické slizniční tolerance (7). Depozice ejakulátu do ženského genitálu zahájí postkoitální zánětlivou reakci a vyvolává imunologickou reakci II. typu. Zahájením této imunologické odpovědi proti paternálním antigenům může seminální TGF- β 1 potlačit indukci reakce I. typu proti semiallogenímu těhotenství, což je pravděpodobně spojeno s poruchou placentárního vývoje a omezeným fetálním růstem (7). Trofoblastická buněčná invaze do deciduy s její masivní leukocytární infiltrací představuje těsný tkáňový kontakt mezi allogenními buňkami. Imunitní rozpoznání paternálních genů na trofoblastu je

realizováno pomocí natural killers (NK) buněk trofoblastu, které prostřednictvím interferonu gamma ovlivňují přestavbu spirálních arterií. Hladiny IFN γ , který inhibuje migraci cytotrofoblastu v závislosti na počtu NK buněk, byly nalezeny zvýšené u preeklamptických gravidit (8). U žen s rizikem PE, kdy předpokládáme určitý stupeň inkompatibility mezi matkou a plodem v systému HLA, chybí aktivace většiny nebo všech KIR receptorů (killer imunoglobulin-like receptory detekují molekuly HLA I. třídy.) v případě, že plod exprimuje HLA-C2 molekuly (9).

V situaci, kdy PE může být indukována infekcí, je důležité působení Toll- like receptorů (TLR), které jsou součástí vrozeného imunního systému a detekují struktury mikroorganismů, označovaných jako „molekulární znaky patogenů“ (PAMP= pathogen associated molecular patterns) a iniciují produkci cytokinů monocyty (10,11). Trofoblast s exponovanými TLR secernuje ve srovnání s normální graviditou více prozánětlivých cytokinů a chemokinů pro zvýšení imunitní buněčné migrace. Produkce TLR se mění s fenotypem a gestačním věkem trofoblastů (12-17). Buňky placenty ve II. a III. trimestru produkují různé TLR a aktivace těchto receptorů může být spojena s vývojem PE.

Další teorie vzniku PE je založena na **poruše angiogeneze**, která je pozitivně ovlivňována vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF), placentárním růstovým faktorem (PlGF) a protipůsobící solubilní složkou transmembránového receptoru sFlt 1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1). Zvýšená hladina cirkulujícího sFlt1, který in vitro inhibuje invazi cytotrofoblastu a ovlivňuje jeho diferenciaci, je spojena se sníženými cirkulujícími koncentracemi volného VEGF a PlGF s následným endoteliálním poškozením (18). Rozsah zvýšení sFlt1 koreluje se závažností PE a tím podporuje teorii, že rovnováha VEGF a sFlt je v těsném vztahu s jednou z definitivních patofyziologických cest tohoto onemocnění (19).

Endoteliální dysfunkce je nejčastějším klinickým projevem při PE a zahrnuje též zvýšenou buněčnou permeabilitu a agregaci destiček (20). Je patrně součástí větší intravaskulární zánětlivé reakce, zahrnující intravaskulární leukocytózu, koagulaci a systém komplementu. Aktivace endotelu může být způsobena absencí typické stimulace renin-angiotenzinového systému i při trvalé hypovolemii, zvýšenou citlivostí na angiotensin-II a norepinefrin s následnou vazokonstrikcí a hypertenzí a zvýšenou permeabilitou endotelu u rozvinuté preeklampsie (20,21). Endoteliální dysfunkce způsobí pokles v produkci a aktivitě vazodilatačních prostaglandinů, zejména prostacyklinu a kyslíčnicku dusnatého. Zvýšený poměr tromboxanu A₂ k prostacyklinu může dále zhoršit uteroplacentární průtok s následkem trombózy spirálních arterií a placentárních infarktů. Při PE dochází pravděpodobně následkem aktivity zánětlivých cytokinů a volných radikálů ke snížené produkci annexinu V v trofoblastech, která koreluje se zvýšením koagulační aktivity, závažností mateřského onemocnění a závažností IUGR (22). Redukce annexinu V může být opět zhoršena již existující trombofilii. Role fetální trombofilie v příčině placentární vaskulopatie je stále kontroverzní (23-25).

Důležitá teorie o **úloze oxidativního stressu** (OS) v etiopatogenezi choroby vychází z faktu, že u PE dochází k dysbalanci se zvýšenou tvorbou peroxidových radikálů, následnou peroxidací lipidů a zvýšenou oxidací proteinů a DNA. Na procesu se podílí

zvýšená apoptóza placentárního trofoblastu. U pacientek s PE je snížená přirozená antioxidační schopnost.

Autoimunitní procesy jsou dlouhodobě spojovány s preeklampií (26,27). Studie prokázaly, že ženy s PE mají agonistické autoprotilátky proti receptoru typu I (AT 1) pro angiotensin II (28,29). Předpokládá se, že aktivace AT1 receptoru autoprotilátkami indukuje tvorbu TNF- alfa a jeho zvýšená produkce může být základním mechanismem přispívajícím k vysvětlení patofyziologie PE. S autoimunitní teorií vzniku PE jsou spojovány i **antifosfolipidové protilátky** (APA), které jsou velmi heterogenní skupinou protilátek, působící proti plazmatickým proteinům, vázajícím fosfolipidy. Část APA má trombogenní účinek, u této skupiny se uplatňuje ve spojení s fosfolipidy plazmatický kofaktor β 2 - glykoprotein I (36-39). Jedna z mnoha klasifikací zahrnuje dělení APA podle užitého antigenu v ELISA metodě na protilátky antikardiolipinové, anti β 2- glykoproteinové a antifosfolipidové protilátky proti jednotlivým fosfolipidům např. fosfatidylserinu, fosfatidylcholinu, fosfatidylinositolu, fosfatidylethanolaminu a kyselině fosfatidové. Protilátky proti protrombinu méně korelují s klinickými projevy trombóz. Trombogenní APA jsou spojeny s antifosfolipidovým syndromem (APS), který je definován řadou klinických příznaků : rekurentními venózními či arteriálními trombózami, porodem mrtvého plodu, opakovanými potraty a předčasnými porody, spojenými s PE (40).

Prevalence APS mezi rodícími ženami se vyskytuje v rozmezí 0,3- 9,1 %. Na působení APA se spolupodílí defekt buněčné apoptózy, který expozicí membránových fosfolipidů umožní jejich spojení s různými plasmatickými proteiny, následně vzniklý komplex je cílem autoprotilátek. β 2- glykoprotein 1 může aktivovat dendritické buňky podobně jako Toll-like receptor 4 a tím podporovat tvorbu autoprotilátek. Mimo trombogenního efektu je u PE zvažován přímý efekt APA na poškození placentárního trofoblastu a redukci jeho invazivity a diferenciaci, dále na formaci syncytia a na inhibici lidského choriového gonadotropinu (hCG).

V souvislosti s APS a PE je diskutována **přítomnost trombofilních stavů** (Leidenská mutace genu V. faktoru, mutace genu protrombinu 20210A, polymorfismy genu pro MTHFR (677 CT) a MTHFR (1298 AC), deficience antitrombinu, proteinu C a proteinu S aj.), spojovaných s trombotickými změnami v uteroplacentárním a intervilózním prostoru a manifestujícími se ve formě infarktů a nekróz s následným rozvoje placentární insuficience.

V rámci **genetické teorie PE** byl publikován model odhadující 31 % dědičnost PE a 20 % dědičnost gestační hypertenze (30). Pravděpodobně neexistuje pouze jediný gen pro PE. Nyní je upřednostňována teorie rostoucího počtu vnímavých genů, z nichž mnohé ovlivňují mateřský kardiovaskulární nebo koagulační systém či regulují mateřskou zánětlivou odpověď. Studie genomu identifikovaly nejméně tři genové lokusy, mající podstatný vztah k PE: 2p12, 2p25 a 9p13 (31) a svoji roli mají i epigenetické jevy např. genomický imprinting (32,33).

2 Cíl práce

Preeklampsie představuje poměrně dlouho definované onemocnění a vzhledem k rozmanitosti etiopatogenetických mechanismů není v současné době doporučený jednotný algoritmus vyšetření, který by odhaloval chorobu v dostatečném předstihu před klinickými symptomy a s dostatečnou specifitou. Z řady vědeckých studií zaměřených na imunologicky podmíněnou problematiku preeklampsie vyplývají protichůdné výsledky v hodnocení jednotlivých prediktivních markerů.

Cílem naší práce byla analýza dvou skupin rizikových faktorů, u kterých je předpoklad asociace s preeklampsí: antifosfolipidových protilátek a vrozených trombofilních stavů.

Cílem první části práce bylo stanovit hladiny osmi vybraných antifosfolipidových protilátek (*proti fosfatidylserinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylinositolu, fosfatidylglycerolu a kyselině fosfatidové, annexinu V, kardiolipinu a β 2- glykoproteinu I*) u žen s preeklampsí v období těsně před terminací gravidity, porovnat tyto hodnoty s hodnotami kontrolního souboru žen a zjistit, zda přítomnost těchto protilátek může být důležitým markerem pro stanovení rizika vývoje preeklampsie v pozdní gestaci.

V druhé části práce jsme si kladli za cíl vyšetřit přítomnost vybraných vrozených trombofilních stavů (*genové mutace MTHFR, FV, F II*) u žen s preeklampsí, porovnat tyto výsledky s hodnotami kontrolního souboru žen a stanovit, zda vyšetřování těchto faktorů by byla přínosná pro stanovení rizika vývoje preeklampsie v pozdní gestaci.

3 Materiál a metodika

3.1 Soubor

Vyšetřovaný soubor tvořily ženy s diagnózou preeklampsie (PE), které byly hospitalizovány v období od 1. 1. 2007 do 31. 12. 2008 na Gynekologicko- porodnické klinice Fakultní nemocnice v Plzni a hospitalizace byla ukončena porodem. Diagnóza PE byla stanovena na základě kombinace klinického nálezu a biochemických parametrů dle diagnostických kritérií doporučených American College of Obstetricians and Gynecologist (35).

Vstupními kritérii do studie bylo zvýšení krevního tlaku (TK) nad 140/ 90 mm Hg, detekce proteinurie (při vyšetření dvou jednorázových vzorků moči, získaných v 6 hodinovém intervalu hodnota vyšší než 300 mg/ l) a přítomnost dvou dalších příznaků (elevace hladiny kyseliny močové v séru, oligurie méně než 500 ml/ 24 hodin, plicní edém, bolesti hlavy, poruchy visu, bolest v epigastriu nebo v pravém horním břišním kvadrantu). Ženy s preeklampsí měly negativní anamnézu na výskyt cévní trombózy, na přítomnost přidruženého autoimunitního onemocnění či genitální infekce. Podmínkou zařazení do studie byl rovněž negativní výsledek sérologického vyšetření protilátek proti syfilis, proti viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) a proti povrchovému antigenu hepatitidy B viru

(HbSAg). Celkem bylo zařazeno 55 žen. Kontrolní skupinu tvořilo 55 zdravých žen, které porodily ve sledovaném období na Gynekologicko-porodnické klinice LF UK a FN v Plzni. Podmínkou pro zařazení do kontrolní skupiny byla absence preeklampsie, negativní anamnéza na výskyt abortů, hypertenze, arteriálních nebo venózních trombóz a autoimunitních chorob a negativní výsledek sérologického vyšetření protilátek proti syfilis, HIV a HbsAg. V době vyšetření ženy neměly akutní genitální infekci a byly afebrilní. Ve všech případech byly ženy před zahájením studie informovány a podepsaly informovaný souhlas. Studie byla vedena dle zásad správné klinické praxe v rámci Helsinského protokolu (34).

3.2 Protokol studie

Po zařazení do skupin byly ženám odebrány anamnestické údaje, týkající se předešlých gravidit s důrazem na výskyt PE a provedeno gynekologické vyšetření. U žen byl vypočten body - mass index (BMI) dle vzorce: hmotnost pacienta v kilogramech byla dělena druhou mocninou jeho výšky v metrech. Měření krevního tlaku bylo prováděno u sedících žen rtuťovým tonometrem s přiměřeně širokou manžetou. Diastolický tlak byl odečítán při vymizení ozev (V. fáze Korotkovových fenoménů), vstupní měření krevního tlaku bylo prováděno třikrát, z 2. a 3. měření byla vypočítána průměrná hodnota. V první době porodní byly ženám odebrány vzorky venózní krve na analýzu základních biochemických parametrů (vyšetření krevního obrazu, stanovení sérové hladiny kyseliny močové, močoviny, sodíku, draslíku, chloridů, celkové bílkoviny, albuminu, haptoglobinu, laktátdehydrogenázy, alaninaminotransferázy, aspartátamniotransferázy, gama glutamyltransferázy a C-reaktivního proteinu), na vyšetření hladin antifosfolipidových protilátek a na detekci trombofilních faktorů. Ve vzorcích moče byla stanovena kvalitativně a semikvantitavně přítomnost proteinurie. V případě zhoršujících projevů PE byla gravidita okamžitě ukončena operativním porodem.

3.3 Metodika studie

3.3.1 Metodika stanovení hladin antifosfolipidových protilátek

Ženám bylo odebráno 5 ml srážlivé venózní krve. Získaná odseparovaná séra byla skladována při teplotě -18 stupňů do vyšetření antifosfolipidových protilátek (APA). Testovaná séra byla bez známek hemolýzy. Pro detekci APA protilátek, zaměřených proti fosfatidylserinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylinositolu, fosfatidylglycerolu a kyselině fosfatidové byl použita home-made metoda ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay), která byla standartizována podle doporučení Evropského fóra antifosfolipidových protilátek z r. 2004 pro detekci antifosfolipidových protilátek (bez ohledu na způsob kalibrace detekční soupravy). Vyšetření byla prováděna v dubletu, k výpočtu cut-off byl použit 95 % interval spolehlivosti a byly použity dvě externí kontroly - jedna nižší nežli cut-off a druhá středně pozitivní. Polystyrenové mikrotitrační destičky MaxiSorp (Nunc-Immuno™ Plates) byly potaženy 50 uml fosfolipidu (50 ul /ml metanol) a ponechány přes

noc při teplotě 4°C. Použité purifikované fosfolipidy byly získány z komerčního zdroje (Sigma, St. Louis, Mo, USA). Následující den byly jamky destiček blokovány roztokem, obsahujícím 10% fetální bovinní sérum v 1M Tris buffered saline (TBS: 250 mol/l Tris, 1,5 mol/l NaCl) po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Následně byly polystyrenové mikrotitrační destičky promyty třikrát v pufovacím roztoku (Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₃P₆O₄, pH 9,6). Séra žen z vyšetřovaného i kontrolního souboru byla naředěna v poměru 1:50 v TBS (s obsahem 10% fetálního bovinního séra), byla poté přidána do jamek titrační destičky. Následovala dvouhodinová inkubace destiček při pokojové teplotě a destičky pak byly pětikrát promyty TBS, obsahujícím 0,05% Tween 20. Poté bylo přidáno 50 ul antihumánního imunoglobulinu IgA, IgG, IgM konjugovaného s peroxidázou a inkubováno po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byly destičky pětikrát promyty v TBS - Tween. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo aplikováno 50 ul chromogenního substrátu a inkubováno v temnu po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 50 ul 2 mol / l kyseliny sírové (H₂SO₄) na 1 jamku. Optická hustota každé jamky byla stanovena pomocí automatického vertikálního spektrofotometru Titertek Multiscan MCC/340 (Flow Lab, Londýn, Velká Británie) při vlnové délce 492 nm. Základní optická hustota vzorků byla stanovena u všech patientských sér, řaděných 1:50 v jamkách na identických mikrotitračních destičkách potažených metanolem, avšak bez fosfolipidů. Výsledky byly vyjádřeny v delta OD (optical density). Pro detekci a kvantifikaci sérových anti-annexinových protilátek v izotopech IgG a IgM byl použit komerčně vyráběný ELISA testy Anti-Annexin V (GA Generic Assays GmbH, Dahlewitz, Germany), výsledky byly vyjádřeny v U/ml.

Antikardiolipinové protilátky (ACLA) v izotopech IgG a IgM byly stanovovány pomocí komerčně vyráběného testu Anti-Cardiolipin IgG/ IgM (Organtec Diagnostika GmbH, Mainz, Germany), výsledky byly vyjádřeny v jednotkách GPL a MPL U/ml pro ACLA. Anti-β₂-glykoproteinové protilátky (anti β₂-GPI) v izotopech IgG a IgA byly detekovány a kvantifikovány pomocí komerčně vyráběného testu Anti β₂-glykoprotein 1 ELISA (Euroimmun, Lubeck, Germany). Výsledky byly vyjádřeny v U/ml pro anti β₂-GPI (36-40).

Tabulka 1

Referenční cut-off hodnoty jednotlivých antifosfolipidových protilátek v IgG a IgM izotopu, vyšetřovaných home-made metodou ELISA

	IgG	IgM
protilátky proti:		
kyselině fosfatidové	> 0,1	> 0,1
fosfatidylethanolaminu	> 0,1	> 0,1
fosfatidylinositolu	> 0,1	> 0,1
fosfatidylglycerolu	> 0,1	> 0,1
fosfatidylserinu	> 0,1	> 0,1

Legenda: hodnoty udány v mezinárodních jednotkách na ml (U/ml).

IgG- imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M

Tabulka 2

Referenční cut - off hodnoty jednotlivých antifosfolipidových protilátek, vyšetřovaných komerčně vyráběnými sety

	IgG	IgM	IgA
protilátky proti:	pozitivní	pozitivní	pozitivní
β2 glykoproteinu I	> 20		> 10
annexinu V	> 18	> 18	
kardiolipinu	> 10	> 10	

Legenda: hodnoty udány v mezinárodních jednotkách na ml (U/ml)

IgG- imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M; **IgA** - imunoglobulin A

3.3.2 Metodika stanovení trombofilních stavů

Stanovení trombofilních stavů prováděla certifikovaná laboratoř Oddělení lékařské genetiky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň. Vyšetření mutací v genech trombofilních faktorů (MTHFR, FV a FII) bylo provedeno analýzou DNA lymfocytů periferní krve pomocí metody real-time PCR. Krev byla odebrána rodičkám na porodním sále v první době porodní a to jak u zkoumané skupiny pacientek s preeklampsií, tak i u zdravých rodiček, které sloužily jako kontrolní soubor. Krev byla odebrána do zkumavky s EDTA s objemem v rozmezí 2- 4 ml krve a do zpracování byla skladována při 4-8°C. Každý vzorek byl zaevidován a označen tak, aby byl v budoucnu jednoznačně dohledatelný. Ze vzorku plné krve byla DNA izolována pomocí kitu QIAAmp DNA Mini (QIAGEN) přesně podle návodu výrobce. DNA byla z buňky uvolněna po buněčné lýze, které bylo dosaženo v roztocích obsahujících velké množství chaotropních iontů v přítomnosti Proteinázy K. Přidáním vhodného množství ethanolu bylo dosaženo patřičných podmínek pro navázání DNA na silikonovou membránu kolonky. Toto navázání je reverzibilní a specifické pro nukleové kyseliny. Proplachovací kroky sloužily k odstranění nečistot a kontaminace. Ve finálním kroku byla DNA z membrány uvolněna roztokem o nízké iontové síle v mírně alkalickém elučním pufru. Výsledek izolace byl zkontrolován spektrofotometricky a výsledná koncentrace DNA byla upravena tak, aby odpovídala požadavkům pro následnou RT-PCR analýzu (40-60 ng/ul). Trombofilní mutace byly vyšetřeny pomocí kitů pro daný typ mutace. Pro mutaci C667T v genu pro MTHFR byl použit Kit QGENE MTHFR C667T, pro mutaci A1298C v genu pro MTHFR kit QGENE MTHFR A1298C, pro mutaci v genu pro faktor V kit QGENEFV a pro mutaci v genu pro faktor II kit QGENEFII, všechny od firmy IAB a.s. Analýza byla provedena na real-time PCR přístroji RotorGene 6000 (Corbett Research). Teplotní profil PCR reakce byl na přístroji nastaven přesně podle návodu výrobce kitů. PCR reakce byla připravena smícháním

Master mixu daného kitu se vzorkem DNA Analýza vzorků byla provedena softwarem RotorGene 6000 na základě alelově specifické diskriminace, která umožňuje rozlišit zdravého homozygota, heterozygota a nemocného homozygota pro danou analyzovanou mutaci.

3.3.3 Ostatní biochemická vyšetření

Přítomnost bílkoviny v moči byla stanovována ve vzorcích moče detekčním proužkem typu PHAN, Lachema, u kterého jako indikátor je použita tetrabromfenolová modř (vizuální škála má stupně 0 - 0.3 - 1 - 3 - nad 10 g/ l). Vyšetření krevního obrazu a ostatních laboratorních parametrů byla provedena v laboratořích Ústavu klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň.

3.4 Statistika

Statistická analýza byla provedena s užitím STATISTICA 9.0. (StatSoft, Tulsa - U.S.A.). Pro měření parametry v celém souboru a v jednotlivých skupinách a podskupinách byly stanoveny základní statistické údaje: průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum a maximum. Vybrané statistické údaje byly zpracovány graficky do tzv. krabicových grafů (Box & Whisker plot diagramů) a histogramů. Kategorické proměnné byly testovány užitím Fisherova exaktního testu a frekvence těchto proměnných byly popsány pomocí kontingenčních tabulek. Vzhledem k distribuci zkoumaných proměnných byl na porovnání jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách použit Wilcoxonův dvouvýběrový neparametrický test. Pro zjištění závislosti mezi zkoumanými znaky, vzhledem k negaussovskému rozdělení těchto proměnných, byl použit Spearmanův koeficient korelace. Pomocí specifit a senzitivit dané metody jsme stanovovali referenční meze (cut off) mezi skupinami a podskupinami pro danou metodu.

4 Výsledky

Do studie bylo zařazeno celkem 55 žen s preeklamsií, stejný počet žen tvořil kontrolní soubor. Základní charakteristiky obou souborů (věk, BMI, prevalence kuřaček) nevykazovaly podstatné rozdíly. Při hodnocení parity žen s preeklamsií bylo zjištěno 40 (72,7 %) primipar a pouze 15 (27,3%) žen byly multipary. U 47 (85 %) žen s preeklamsií bylo indikováno ukončení gravidity operativně. Rozdíly v těchto sledovaných parametrech byly statisticky významné ve srovnání s kontrolním souborem. Průměrná délka gravidity u žen s preeklamsií byla statisticky signifikantně nižší než u kontrolního souboru, 32 % (18) gravidit bylo ukončeno operativně před dokončeným 34. týdnem gestace. Incidence závažné preeklampsie činila celkem 40 % (22 žen). Statisticky významné rozdíly mezi oběma soubory byly zjištěny v hodnotách průměrného systolického a diastolického krevního tlaku a v počtu trombocytů.

Závažná proteinurie, hodnocená vizuálně na detekčním proužku stupněm nad 5, byla přítomna u 7 (12,7%) žen v souboru s preeklampsií. Uvedená data jsou přehledně zobrazena v **tabulce 3**.

Tabulka 3

Základní charakteristiky souboru žen s preeklampsií a kontrolního souboru

Charakteristika	Soubor žen s preeklampsií (n-55)	Kontrolní soubor (n-55)	<i>p</i>
Věk (roky)	29,6 (4,51)	30,0 (4,90)	0,65 *
BMI (kg /m ²)	31,6 (3,88)	31,1 (2,71)	0,70 *
Parita - primipary (n)	40/ 55	27/ 55	< 0,01 ***
- multipary (n)	15/ 55	31/ 55	
Kuřačky (n)	11/ 55	6 / 55	0,29 **
Porod per s.c. (n)	47/55	11/55	< 0,0001 ***
Gestační týden	34+6 (2,51)	40+1 (8,35)	< 0,0001 *
Hodnoty TKs (mmHg)	162,4 (10,8)	123,6(13,7)	< 0,0001 *
HodnotyTKd (mmHg)	102,4(6,37)	83,4 (6,90)	< 0,0001 *
Počet trombocytů (tis.)	196 (88)	276 (75)	< 0,0001 *
Proteinurie (n)	7/55	0/55	< 0,0001

Legenda: Čísla v parametrech : věk, BMI, TK systolický,TK diastolický, počet trombocytů, gestační týden uvádějí průměrné hodnoty čísla v závorkách vyjadřují směrodatné odchylky. *p* - hladina významnosti . (* - Wilcoxonův test, ** - Fisherův exaktní test, *** - chi-square test).

BMI - body mass index; **TKs** - systolický krevní tlak; **TKd** - diastolický krevní tlak

Tabulka 4

Výskyt pozitivních hladin jednotlivých analyzovaných antifosfolipidových protilátek nad arbitrážně stanovenou hodnotu cut-off v souboru žen s preeklampsií a v kontrolním souboru

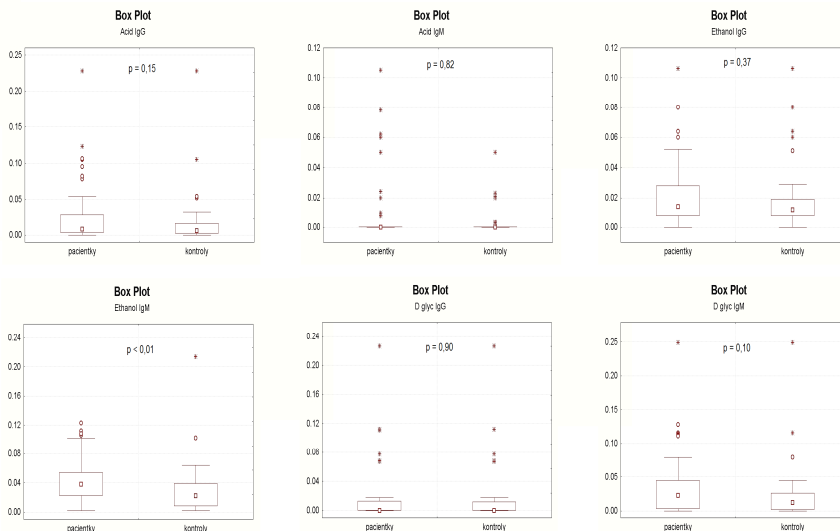
protilátky proti:	Soubor žen s preeklampsií (n-55)			Kontrolní soubor (n-55)		
	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
kyselině fosfatidové	6 / 55	0 / 55		0 / 55	0 / 55	
fosfatidylethanolaminu	1 / 55	6 / 55		0 / 55	0 / 55	
fosfatidylinositolu	5 / 55	0 / 55		0 / 55	0 / 55	
fosfatidylglycerolu	1 / 55	6 / 55		0 / 55	0 / 55	
fosfatidylserinu	7 / 55	2 / 55		0 / 55	0 / 55	
kardiolipinu	5 / 55	5 / 55		0 / 55	0 / 55	
annexinu V	2 / 55	0 / 55		0 / 55	0 / 55	
β2 glykoproteinu I	2 / 55		17 / 55	0 / 55		1 / 55

IgG- imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M; **IgA** - imunoglobulin A

4.1 Výsledky vyšetření jednotlivých antifosfolipidových protilátek

Vyšetřením protilátek proti kyselině fosfatidové, fosfatidylethanolaminu a fosfatidylglycerolu v izotopech IgG a IgM byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny protilátky proti fosfatidylethanolaminu v izotopu IgM ($p < 0.01$) u skupiny žen s pre eklampsí. Hladiny ostatních protilátek se statisticky nelišily. **Graf 1**

Graf 1

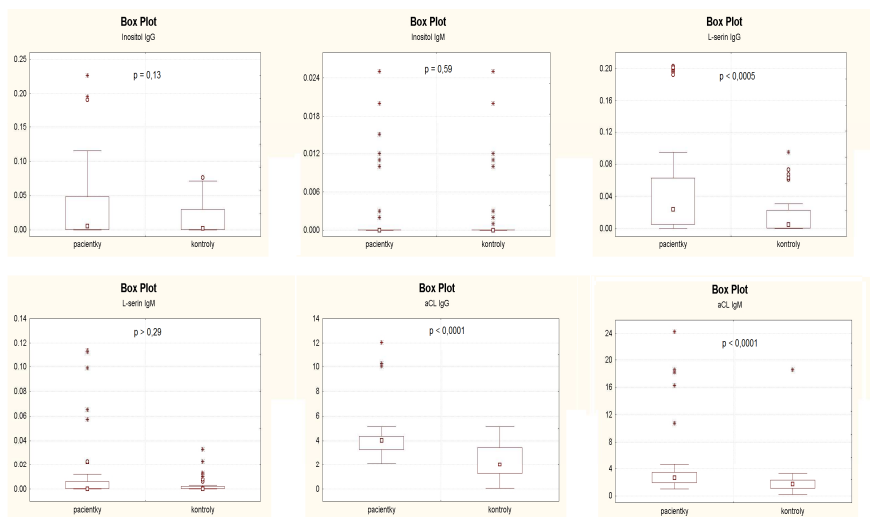


Legenda: Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka (Non outlier Min) a horní úsečka (Non outlier Max) odpovídají minimální a maximální hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty ($\times 25 - 1,5$ IQR a $\times 75 + 1,5$ IQR), hvězdičky ukazují extrémní hodnoty (Extremes).

Acid IgG - kyselina fosfatidová; **Ethanol** - fosfatidylethanolamin; **D glyc** - fosfatidylglycerol; **IgG** - imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M.

Vyšetřením protilátek proti fosfatidylinositolu, fosfatidylserinu a kardiolipinu v izotopech IgG a IgM byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny protilátky proti fosfatidylserinu v izotopu IgG ($p < 0.01$) a proti kardiolipinu v izotopu IgG a IgM ($p < 0.01$), u skupiny žen s pre eklampsí. Hladiny ostatních protilátek nebyly statisticky rozdílné. **Graf 2**

Graf 2

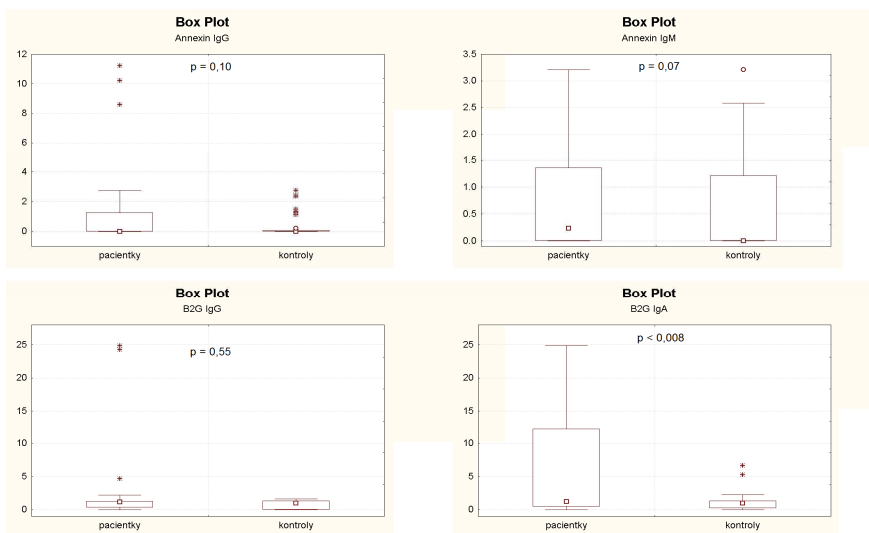


Legenda: Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka (Non outlier Min) a horní úsečka (Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty ($\times 25 - 1,5$ IQR a $\times 75 + 1,5$ IQR), hvězdičky ukazují extrémní hodnoty (Extremes).

Inositol -fosfatidylinositol, **L-Serin**- fosfatidylserinu **aCL**- kardiolipinu; **IgG**- imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M.

Analýzou protilátek proti annexinu V v izotopech IgG a IgM a β 2-glykoproteinu I v izotopech IgG a IgA byla zjištěna staticky významně zvýšená hladina protilátky proti β 2-glykoproteinu-I v izotopu IgA ($p < 0,01$). **Graf 3**

Graf 3



Legenda: Krabicový graf vyjadřující interkvartilové rozmezí (IQR). Čtvereček označuje medián naměřených hodnot, dolní úsečka (Non outlier Min) a horní úsečka (Non outlier Max) odpovídají minimálním a maximálním hodnotám, které nejsou odlehlými hodnotami; kolečka (Outliers) zobrazují odlehlé hodnoty ($x_{25} - 1,5 \text{ IQR}$ a $x_{75} + 1,5 \text{ IQR}$), hvězdičky ukazují extrémní hodnoty (Extremes).

Annexin - annexin V; **B2-** beta2 glykoprotein I; **IgG-** imunoglobulin G; **IgM** - imunoglobulin M; **IgA** - imunoglobulin A.

4.2 Korelační analýza

V souboru pacientek s preeklampií byla nalezena pozitivní korelace BMI a hladinou antifosfolipidové protilátky proti β 2-glykoproteinu I v izotopu IgA ($r = 0,5176$; $p < 0,05$). Dále byla při korelační analýze zjištěna u pacientek s preeklampií pozitivní korelace mezi hodnotou krevního systolického tlaku a hladinou antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu v izotopu IgG ($r = 0,5397$; $p < 0,05$) a v izotopu IgM ($r = 0,6169$; $p < 0,05$). Slabě pozitivní korelace byla nalezena mezi hodnotou krevního diastolického tlaku a hladinou antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu v izotopu IgG ($r = 0,4821$; $p < 0,05$).

4.3 Vyšetření trombofilních stavů

Ve sledovaném souboru pacientek s preeklampií (n = 55) molekulárně genetické vyšetření odhalilo 2 (3,64%) pacientky s mutací F V Leiden (heterozygotní forma), 1(1,82 %) pacientku s mutací G20210A genu pro protrombin (heterozygotní forma). Celkem u 5 (9,09 %) pacientek byla nalezena mutace v genu pro methylen-tetrahydrofolát-reduktázu - MTHFR C677T (z toho 1 v homozygotní formě). Při vyšetřování prevalence mutace v genu pro methylen-tetrahydrofolát-reduktázu -MTHFR A1298C bylo nalezeno celkem 8 (14,5%) pacientek s pozitivitou (z toho 2 v homozygotní formě). V kontrolní skupině žen (n = 55) byla potvrzena mutace F V Leiden u 1(1,82 %) ženy (heterozygotní forma). Pouze 1(1,82 %) žena měla detekovanou mutaci G20210A genu pro protrombin (heterozygotní forma). U 7 (12,7 %) žen byla přítomna mutace v genu pro MTHFR C677T (všechny v heterozygotní formě). Stejný počet žen 7(12,7 %) měl zjištěnou mutaci v genu pro methylen-tetrahydrofolát-reduktázu-MTHFR A1298C (všechny v heterozygotní formě). Mezi jednotlivými soubory nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v prevalenci vyšetřovaných trombofilních stavů.

Tabulka 5

Srovnání prevalence trombofilních stavů u souboru žen s preeklampií a kontrolního souboru

	Soubor žen s preeklampií (n-55)	Kontrolní soubor (n-55)	Odds ratio (95 % CI)	<i>p</i>
Faktor V Leiden +/-	2 (3,64 %)	1 (1,82 %)	0,38 (0,18 - 23,15)	1,00
Faktor II F G20210A +/-	1 (1,82 %)	1 (1,82 %)	1,00 (0, 06 - 16,40)	1,00
Mutace MTHFR C677T +/+ a +/-	5 (9,09 %)	7 (12,7 %)	0, 68 (0,20 - 2.30)	0,76
Mutace MTHFR A1298C +/+ a +/-	8(14,6 %)	7 (12,7 %)	0, 85 (0, 29 - 2, 55)	0,78

Legenda : +/- - heterozygot; +/+ - homozygot

5 Diskuze

5.1 Vyšetření jednotlivých typů antifosfolipidových protilátek

Názor, že zvýšený výskyt pozitivních hladin antifosfolipidových protilátek (APA) je nalézán ve spojitosti s preeklampsií (PE) byl poprvé vyjádřen u žen s antifosfolipidovým syndromem (APS) (41- 44). Pozitivní hodnoty APA byly zjištěny u 25 % žen, které porodily růstově retardované plody (45) a byly spojeny se IUGR u gravidit, komplikovaných PE. (46). U žen s APA byla prokázána PE s časným nástupem v graviditě v 14, 6 % a s abrupcí placenty v 18,8%. Naproti trvale vysokému počtu PE přítomných u žen s již dříve prokázaným APS, existuje mezi studii široké rozpětí prevalence pacientek s APA, u kterých dojde k rozvoji PE a tato pravděpodobnost se zvyšuje s přítomností dalších rizikových faktorů (46,47,48,49). Zvýšený výskyt APA protilátek u žen s PE a těžkou PE byl pozorován u žen s prokázanými antikardiolipinovými protilátkami (47,48,49). Studie, které se zabývaly predikcí PE na velkých souborech zjistily, že prevalence APA u probandek s vývojem PE činila 2% -7% (50-52). V našem souboru pacientek s PE byl sumárně výskyt pozitivních hladin APA 31% a byl významně vyšší ve srovnání s kontrolním souborem (1,8%). Jednou z možných hypotéz pro tento nálezn je vysoká incidence nullipar v souboru s PE a je známo, že předchozí gravidita končící porodem, má vysoce protektivní imunologický efekt. Dalším vysvětlením pro vysokou incidenci pozitivních nálezn APA by mohla být závažnost PE, která vedla k ukončení 32% gravidit před 34. týdnem gestace císařským řezem. U pacientek s časným nástupem PE je udávána vyšší pozitivita APA (53). Poněvadž jedním ze vstupních kritérií pacientek byla absence anamnézy vaskulárních trombóz, APS či jiných přidružených autoimunitních chorob, předpokládáme, že se na zvýšené incidenci protilátek mohla spolupodílet i stressová situace, vyvolaná akutním ukončením gravidit převážně operativní cestou (54).

Nejčastěji tzn. u 17 (30%) žen s PE byla nalezena pozitivita **protilátky proti β -2 glykoproteinu I (β -2GPI)**, který se vyznačuje velkou afinitou k negativně nabitým fosfolipidům (např. kardiolipinu, fosfatidylserinu, fosfatidylinositolu). Po vzniku vazby β -2GPI s fosfolipidy dojde k jeho konformační změně a vzniklý trimolekulární komplex (dimer β -2-GPI a autoprottilátka), vázaný na povrch fosfolipidů, pak iniciuje u preeklampsie prokoagulační stav spojený s lokální aktivací komplementu a rezultující ve vývoj placentární infarzace. Dalším mechanismem působení β -2GPI může být jeho vazba s ostatními APA, která vede k aktivaci proliferace endoteliálních buněk placentárních cév a ke vzniku cévní okluze.

V naší práci byly detekovány statisticky významně vyšší plazmatické hladiny protilátek proti β - glykoproteinu-I v izotopu IgA (anti- β -2-GPI IgA) u pacientek s PE ve srovnání s kontrolní skupinou žen ($p < 0,0086$). Předpokládá se, že anti- β -2-GPI v izotopu IgA může inhibovat proliferaci trofoblastu in vitro. I když je ve spojitosti s APS kladen důraz zejména na průkaz izotopů IgG a IgM a horší průběh onemocnění je spojován s vysokými titry v izotopu IgG2, izolovaná přítomnost anti- β -2-GPI IgA ve spojitosti s APS, opakovaným potrácením a SLE byla nalezena v řadě prací (55-60). Pozitivita hladiny anti β - GPI v izotopu IgA také pozitivně korelovala s body-mass indexem žen s PE. Obezita je spojena se stavem chronického zánětu mírného stupně. Adipózní tkáň je charakterizována infiltrací makrofágů, které jsou důležitým zdrojem zánětlivých cytokinů (61). Druhou nejčastější

APA nalezenou u 10,9 % žen s PE v našem souboru byla protilátka proti **fosfatidylserinu**. Plazmatické hladiny protilátek proti fosfatidylserinu v izotopu IgG byly statisticky významně vyšší u pacientek s PE ve srovnání s kontrolní skupinou žen ($p < 0,0005$) a rovněž byly nalezeny statisticky významné rozdíly v četnosti zkoumaného parametru mezi sledovanými skupinami ($p < 0,002$). Nověji se předpokládá, že APA negativně ovlivňuje proliferaci a maturaci trofoblastu. Součástí vazby protilátky proti fosfatidylserinu, který je exponován na externí buněčné membráně trofoblastu, je opět β -2 glykoprotein I. Tento komplex může negativně působit na diferenciaci trofoblastu včetně formace syncytia.

Zajímavé bylo naše zjištění, že v souboru pacientek s PE se plazmatické hladiny protilátek proti **annexinu V** v izotopu IgG ani v izotopu IgM signifikantně nelišily od hodnoty protilátek žen z kontrolní skupiny. Annexin V je důležitý endogenní antikoagulační protein, exprimovaný na povrchu vilózního syncytiotrofoblastu, s vysokou afinitou zejména k fosfatidylserinu. In vitro však bylo prokázáno, že annexin může být odstraněn z placentárního povrchu BeWo buněk (buněčná linie trofoblastu, získaná z choriokarcinomu) pomocí monoklonálních antifosfatidylserinových protilátek a tím dojde k expresi prokoagulačního povrchu trofoblastu (74).

Protilátky proti **kardiolipinu** (ACLA) patří mezi hlavní skupiny protilátek, jejichž přítomnost podmiňuje existenci APS. Ve dvou srovnávacích studiích bylo při průkazu ACLA a lupus antikoagulans (nebo obou) bylo prokazatelně zvýšeno riziko vzniku PE (50,51). V našem souboru pacientek s PE byly nalezeny ACLA v izotopu IgG statisticky významně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou žen ($p < 0,0001$) a zároveň rozdíly v četnosti zkoumaného parametru mezi sledovanými skupinami byly statisticky významné ($p < 0,05$). Plazmatické hladiny ACLA v izotopu IgM u pacientek s PE se rovněž statisticky významně lišily od hodnot v kontrolní skupině žen ($p < 0,0001$), ale při hodnocení četnosti zkoumaného parametru jsme nenalezli statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami. Tyto nálezy jsou ve shodě se závěry metaanalýzy, která konstatovala, že střední až vysoké titry ACLA jsou spojeny s touto základní chorobou u pacientek bez prokázané autoimunitní choroby, u těžké formy PE byla tato asociace ještě výraznější (62).

5.2 Vyšetření trombofilních stavů

V naší práci jsme se zaměřili na analýzu bodových mutací genů kódujících koagulační faktory V(FVL, Leidenská mutace), protrombin II a dvě bodové mutace enzymu methylen-tetrahydrofolát- reduktázy (MTHFR), které představují nejčastější dědičné koagulační poruchy v populaci a jsou asociovány s řadou porodnických komplikací (opakované potrácení, intrauterinní úmrtí plodu, IUGR a PE). Ve značně nejednotných závěrech studií, týkajících se souvislosti PE a trombofilii, část prací předpokládá jejich vzájemnou korelaci (63) Mimo již diskutovaných teorií o vzniku PE je předpokládána i trombóza placentárních cév s následnou redukcí krevního průtoku. Trombotické změny mohou postihovat i fetální část oběhu a histopatologické změny jsou shrnovány pod pojem trombotická vaskulopatie plodu a zahrnují hemorhagickou endovaskulitidu, obliterující endarteriitidu, fibromuskulární sklerotizaci a fibrinoidní vaskulopatii (64). Při hodnocení zahrnující mimo genetických polymorfismů i přítomnost APC rezistence, hyperhomocysteinemie a ACLA byla zjištěna až 40 % prevalence u žen s anamnézou závažné PE (65,66).

Prvním analyzovaným trombofilním stavem byl vrozený defekt V. koagulačního faktoru (FVL). Ve skupině pacientek s PE byla nalezena prevalence 3,64% mutace FVL v heterozygotní formě a nebylo zjištěno zvýšené riziko pro vznik PE (OR 0,38; 95% CI 0,18-23,15). Homozygotní forma mutace nebyla v našem souboru prokázána. Studie zaměřené na výskyt FVL u preeklampiček vykazují značně rozdílné výsledky od vysoce signifikantních (Kupferminc et al. : OR 4,6-5,3) až po zcela negativní (Shaugnessy, De Grooth : OR 1,0 -1,1) (67,68). Vyšetřením bodové mutace genu kódujícího protrombin G20210A jsme v souboru žen s PE našli tuto mutaci v heterozygotní formě pouze v 1,82 % případů. Vzhledem ke shodné prevalenci této mutace u kontrolního souboru nebylo hodnocení možného rizika pro PE validní. Celkově je v Evropě udávána poměrně nízká prevalence heterozygotů s tímto polymorfismem (do 2%) a je popisováno mírné až střední riziko (OR 2,1- 3,8) pro asociaci této mutace a PE (69). Kombinací obou zmíněných mutací se zvyšuje riziko trombotické příhody, v našem souboru tato kombinace však nebyla nalezena.

Při testování termolabilní varianty C677T genu pro enzym methylen-tetrahydrofolát-reduktázu (MTHFR), který ovlivňuje metabolismus homocysteinu, jsme tuto mutaci v obou dvou formách našli v 9,09 % v souboru pacientek s PE, ale kontrolní soubor žen obsahoval dokonce vyšší počet žen s touto trombofilní dispozicí (12,7%). Dle literárních údajů je mutace MTHFR C677T jednou z nejčastějších mutací, vyskytující se v 37 % v heterozygotní formě a v 12 % v homozygotní formě u kavkazské rasy (70). Mutace způsobuje snížení aktivity enzymu s následnou mírnou hyperhomocysteinémií zejména při nízkých hladinách folátů (71). Metaanalýza, specificky zaměřená na polymorfismus C677T MTHFR genu a jeho asociaci s PE, prokázala středně zvýšené riziko u nosiček T alely (MTHFR 677CT a TT) ve srovnání s homozygotními nosičkami C alely (MTHFR 677 CC) (72). Druhým analyzovaným polymorfismem genu pro MTHFR byla mutace A1298C, jejíž prevalence v heterozygotní a homozygotní formě v našem souboru pacientek s PE činila 14,6 % a riziko pro vznik PE nebylo statisticky významné (OR 0, 85; 95% CI 0,29 -2,55). Z výše uvedeného vyplývá, že při vyšetřování trombofilních stavů jsme neprokázali tvrzení, že trombofilie přispívají ke vzniku PE. Naše výsledky jsou jistě ovlivněny velikostí sestaveného souboru, ale jsou i v souladu s již publikovanými literárními pracemi, prezentujícími nízkou prevalenci mutací FVL, protrombinu G20210A a MTHFR C677 T v homozygotní formě u žen s PE (OR 0,6; 95% CI 0,3-1,3) (73).

Jednoznačné prokázání faktu, zda trombofilie účinkuje jako kofaktor v patogenezi PE nebo PE akceleruje její účinek, bude vyžadovat sestavení studie s dostatečnou statistickou výpovědní hodnotou

6 Závěry

6.1 Závěry vyšetření antifosfolipidových protilátek

V souboru pacientek s preeklampií jsme prokázali statisticky významně zvýšené následující plazmatické hladiny níže uvedených antifosfolipidových protilátek ve srovnání s kontrolním souborem zdravých žen:

- a. proti fosfatidylethanolaminu v izotopu IgM ($p < 0,016$),
- b. proti fosfatidylserinu v izotopu IgG ($p < 0,001$),
- c. proti kardiolipinu v izotopu IgG a IgM ($p < 0,001$),
- d. proti $\beta 2$ - glykoproteinu-I v izotopu IgA ($p < 0,01$).

S výjimkou protilátek proti fosfatidylethanolaminu v izotopu IgM a proti kardiolipinu v izotopu IgM byly rovněž nalezeny statisticky významné rozdíly v četnostech zkoumaných parametrů, uvedených v bodě 1, mezi sledovanými skupinami.

V souboru pacientek s preeklampsí byla nalezena pozitivní korelace BMI a hladinou antifosfolipidové protilátky proti $\beta 2$ - glykoproteinu-I v izotopu IgA ($r = 0,5176$; $p < 0,05$). Parametr závažná preeklampsie pozitivně koreloval s hladinou antifosfolipidové protilátky proti $\beta 2$ - glykoproteinu-I v izotopu IgA ($r = 0,7223$; $p < 0,01$).

Hodnota krevního systolického a diastolického tlaku pozitivně korelovala s hladinou hladinou antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu v izotopu IgG ($r = 0,5397$; $p < 0,05$) a v izotopu M ($r = 0,6169$; $p < 0,05$).

Domníváme se, že zvýšené hladiny antifosfolipidových protilátek zejména proti $\beta 2$ - glykoproteinu-I v izotopu IgA, antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu v izotopu IgG a proti serinu v izotopu IgG by mohly splnit roli prediktivního markeru pro preeklampsii u gravidit v pokročilých stadiích.

6.2 Závěry výsledků trombofilních stavů

V dosažených výsledcích nebyla námi prokázána pozitivní korelace výskytu daných mutací a preeklampsie, ačkoliv incidence závažné preeklampsie v našem souboru činila 40 %. Důvodem by mohla být rozdílnost časné a pozdní formy preeklampsie, ale i malá statistická výpovědní hodnota sledovaného souboru. Na základě naší analýzy však nemůžeme vyšetření těchto trombofilních stavů doporučit jako marker ke stanovení rizika preeklampsie.

7 Souhrn

Vyšetřili jsme hladiny osmi nejčastějších antifosfolipidových protilátek (proti fosfatidylserinu, fosfatidylethanolaminu, fosfatidylinositolu, fosfatidylglycerolu, kyselině fosfatidové, annexinu V, kardiolipinu a $\beta 2$ -glykoproteinu I) pomocí ELISA metody a vybrané vrozené trombofilní stavy (mutace F V Leiden, mutace G20210A genu pro

protrombin, mutace v genu pro methylen-tetrahydrofolát-reduktázu -MTHFR C677T a mutaci v genu pro methylen-tetrahydrofolát-reduktázu -MTHFR A1298C, analýzou DNA lymfocytů periferní krve pomocí metody real-time PCR) u padesáti pěti žen s preeklampsí v období těsně před ukončením gravidity. Výsledky jsme srovnali s kontrolním souborem zdravých žen. Statistické hodnocení jsme provedli pomocí Wilcoxonova neparametrického testu, kategorické proměnné jsme testovali Fisherovým exaktním testem a závislosti mezi hladinami jednotlivých protilátek v obou skupinách byly zkoumány pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace.

Prokázali jsme, že ženy s preeklampsí měly signifikantně vyšší hladiny antikardiolipinových protilátek v izotopu IgG ($p < 0.01$) a IgM ($p < 0.01$), hladiny protilátek proti fosfatidylserinu v izotopu IgG ($p < 0.01$) a ethanolaminu v izotopu IgM ($p < 0.01$). Parametr závažná preeklampsie pozitivně koreloval s hladinou antifosfolipidové protilátky proti $\beta 2$ - glykoproteinu-I v izotopu IgA ($r = 0,7223$; $p < 0.01$). V dosažených výsledcích jsme nenalezli pozitivní korelaci výskytu sledovaných trombofilních mutací a preeklampsie.

Zvýšené hladiny antifosfolipidových protilátek zejména proti $\beta 2$ - glykoproteinu-I v izotopu IgA a antifosfolipidové protilátky proti kardiolipinu a serinu v izotopu IgG by mohly být vhodné pro predikci preeklampsie u gravidit v pokročilých stadiích. Naše výsledky současně podporují myšlenku o autoimunitním podkladu preeklampsie.

8 Summary

Our objective was to evaluate plasma levels of the eight most common antiphospholipid antibodies (antiphosphatidylserine, antiphosphatidylethanolamine, antiphosphatidylinositol, antiphosphatidylglycerol, antiphosphatidic acid, antiannexin V, anticardiolipin and anti $\beta 2$ -glycoprotein I antibodies) by ELISA method and selected inherited thrombophilia (F V-Leiden mutation, FII mutation G20210A, C677T and A1298C variants of the gene for methylene tetrahydrofolate reductase-MTHFR) by DNA analysis of peripheral blood lymphocytes using the real-time PCR in fifty-five women with preeclampsia in the period immediately before urgent termination of pregnancy. Fifty-five healthy women without preeclampsia was considered as a control group. Entered data were examined using a non-parametric Wilcoxon's test, univariate analysis were performed using the Fisher's exact test and statistical dependence between variables was assessed using Spearman's rank correlation coefficient. We demonstrated that women with preeclampsia had significantly higher levels of anticardiolipin antibodies in the isotope IgG ($p < 0.01$) and IgM ($p < 0.01$), elevated levels of antiphosphatidylserine antibodies in the isotope IgG ($p < 0.01$) and antiethanolamine antibodies in the isotope IgM ($p < 0.01$) when compared to healthy controls. Parameter severe preeclampsia correlated positively with levels of anti $\beta 2$ -glycoprotein-I antibodies in the isotope of IgA ($r = 0.7223$, $p < 0.01$). The obtained results didn't confirmed a positive correlation between incidence of thrombophilic mutations and preeclampsia. Elevated levels of antiphospholipid antibodies particularly anti- $\beta 2$ -glycoprotein I in the isotope IgA and anticardiolipin and antiphosphatidylserine antibodies in the isotope IgG could be useful for prediction of preeclampsia in pregnancies in advanced stages. Our results also support the idea of autoimmune background of preeclampsia.

9 Literatura

1. **Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner NO.** Sperm exposure and development of preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol* 2003, 188 : 1241-43
2. **Dekker G, Robillard PY.** The birth interval hypothesis- does it really indicate the end of primapaternity hypothesis? *J Reprod Immunol* 2003; 59:245-51
3. **Dekker G, Sibai B.** Primary , secondary and tertiary prevention of pre-eclampsia, *Lancet* 2001, 357: 209-15
4. **Saftlas AF, Levine RJ, Klebanoff MA et al.** Abortion, changed paternity and risk of preeclampsia in nulliparous women *Am J Epidemiol* 2003,157: 1108-14
5. **Wang JX, Knottnerus AM, Schuit Get al.** Surgically obtained sperm and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia *Lancet* 2002; 359: 673-4
6. **Cedegren MI.** Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 2004; 103 219-24
7. **Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S et al.** Transforming growth factor beta-a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol* 2002, 57: 109–28
8. **Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy KM, et al.** Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 2004, 200: 957–65.
9. **Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, et al.** Uterine natural killer cells;insight into their cellular and molecular biology from mouse modeling. *Reproduction* 2003, 126: 149–60.
10. **von Dadelszen P, Magee LA, Kraijden M et al.** Levels of antibodies against cytomegalovirus and Chlamydomphila pneumonie are increased in early onset pre-eclampsia. *BJOG* 2003; 110:725–730.
11. **Hsu CD, Witter FR:** Urogenital infection in preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 1995; 49:271–275.
12. **Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim Y Met al.** Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol* 2004; 173:4286–4296.
13. **Bejar EC, Mallard C, Powell TL.** Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. *Placenta* 2006; 27:322–326.
14. **Rindsjo E, Holmlund U, Sverremark-Ekstrom Eet al.** Toll-like receptor-2 expression in normal and pathologic human placenta. *Hum Pathol* 2007; 38:468–473.
15. **Mitsunari M, Yoshida S, Shoji T et al.** Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E (2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J Reprod Immunol* 2006; 72:46–59.
16. **Ma Y, Krikun G, Abrahams V M et al.** Cell type-specific expression and function toll-like receptors 2 and 4 in human placenta: implications in fetal infection. *Placenta* 2007; 28:1024–1031.
17. **Holmlund U, Cebers G, Dahlfors AR et al.** Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology* 2002; 107:145–151.
18. **Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al.** Excess placental soluble fmslike tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Clin Invest* 2003; 111: 649–58.
19. **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al.** Circulating angiogenic factors and the risk for

- preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350:672-83.
20. **Wang Y, Gu Y, Zhang Y** et al. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 817–24.
 21. **Roberts JM, Redman CWG**. Pre-eclampsia: more than pregnancy induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447–51.
 22. **Shu F, Sugimura Mkanayama N, Kobayashi H** et al. Immunohistochemical study of annexin V expression in placentae of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 49: 17–23.
 23. **Schlembach D, Beinder E, Zingsem J** et al. Association of maternal and/or fetal factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation with HELLP syndrome and intrauterine growth restriction. *Clin Sci* 2003; 105: 279–85.
 24. **Anteby EY, Musalam B, Milwidsky A, et al**. Fetal inherited thrombophilias influence the severity of preeclampsia, IUGR and placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol eprod Biol* 2004; 113: 31–35.
 25. **Livingston JC, Barton JR, Park V** et al. Maternal and fetal inherited thrombophilias are not related to the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001, 185: 153-57
 26. **Gleicher N**: Why much of the pathophysiology of preeclampsia-eclampsia must be of an autoimmune nature. *Am J Obstet Gynecol* 2007, 196:5–e1.
 27. **el-Roeiy A, Myers SA, Gleicher N**. The relationship between autoantibodies and intrauterine growth retardation in hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:1253–1261.
 28. **Bobst SM, Day MC, Gilstrap III LC** et al.: Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce IL-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *Am J Hypertens* 2005, 18:330–336.
 29. **Zhou CC, Ahmad S, Mi T** et al. Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin / nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension* 2008, 51, 1010–1019.
 30. **Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S** et al. The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *BJOG* 2004; 111: 200–06.
 31. **Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V, et al**. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 168–77.
 32. **Oudejans CB, Mulders J, Lachmeijer AM, et al**. The parent-of-origin effect of 10q22 in pre-eclamptic females coincides with two regions clustered for genes with down-regulated expression in androgenetic placentas. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 589–98.
 33. **Cross JC**. The genetics of pre-eclampsia: a fetoplacental or maternal problem? *Clin Genet* 2003; 64: 96–103.
 34. Good medical Council, Good medical practice, London, General medical Council 2006.
 35. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin number 33. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Int.J.Gynaecol Obstet* 2002,77,67-75.

36. **Ulčová-Gallová Z.** Antifosfolipidové protilátky (APA) v gynekologii a porodnictví *Čes. Gynek.* 59, 1994 1, 28-34.
37. **Subrt I, Ulcova-Gallová Z, Bibkova K** et al. Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in Czech women *Am J Reprod Immunol.* 2008,59 (3),193-200.
38. **Ulcova-Gallová Z.** Antiphospholipid antibodies and reproductive failure. *Chem Immunol Allergy* 2005, 88, 139-149.
39. **Ulcova-Gallová Z, Krauz V, Novakova P** et al. Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only. *Am J Reprod Immunol* 2005, 54, (2), 112-117.
40. **Ulcova-Gallová Z, Bouse V, Krizanovska K** et al. Beta 2 glycoprotein I is a good indicator of certain adverse pregnancy conditions. *Int J Fertil Womens Med* 2001, 46,(6) 304-308.
41. **Branch DW, Scott JR, Kochenour NK** et al E. Obstetric complications associated with the lupus Anticoagulant *N Engl J Med* 1985, 313:1322-1326.
42. **Lockshin MD, Druzin ML, Goei S** et al. Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1985, 313:152-156.
43. **Branch DW, Silver RM, Blackwell JL,** et al. Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: an update of the Utah experience. *Obstet Gynecol* 1992, 80:614-620.
44. **Lima F, Khamashta MA, Buchanan NM,** et al. A study of sixty pregnancies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Clin exp Rheumatol* 1996, 14:131-136.
45. **Polzin WJ, Kopelman JN, Robinson RD** et al. The association of antiphospholipid antibodies with pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1991; 78:1108-1111.
46. **Sletnes KE, Wisloff F, Moe N** et al. Antiphospholipid antibodies in pre-eclamptic women: relation to growth retardation and neonatal outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992; 71:112-117.
47. **Milliez J, Lelong F, Bayani N** et al. The prevalence of autoantibodies during third-trimester pregnancy complicated by hypertension or idiopathic fetal growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1991,165:51-56.
48. **Allen JY, Tapia-Santiago C, Kutteh WH.** Antiphospholipid antibodies in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1996, 36,81-85.
49. **Moodley J, Bhoola V, Duursma J** et al. The association of antiphospholipid antibodies with severe early-onset pre-eclampsia. *S Afr Med J* 1995; 85:105-107.
50. **Yasuda M, Takakuwa K, Tokunaga A** et al. Prospective studies of the association between anticardiolipin antibody and outcome of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1995, 86,555-559.
51. **Pattison NS, Chamley LW, McKay E** et al. Antiphospholipid antibodies in pregnancy: prevalence and clinical associations. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100, 909-913.
52. **Katano K, Aoki A, Sasa H** et al. beta 2-Glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies as a predictor of adverse pregnancy outcomes in healthy pregnant women.

- Hum Reprod 1996; 11:509–512.
53. **Branch DW, Andres R, Digre KB** et al. The association of antiphospholipid antibodies with severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1989,73,541–545.
 54. **Segler CP**. Anticardiolipin antibodies as markers of physiologic stress: a case study of idiopathic stroke in a young adult. *Medical Hypotheses* 2004, 63, 461–463.
 55. **Rappaport VJ, Hirata G, Yap HK** et al. Antivascular endothelial cell antibodies in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1990, 162,138–146.
 56. **el-Roeiy A, Myers SA, Gleicher N**. The relationship between autoantibodies and intrauterine growth retardation in hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 164,1253–1261.
 57. **Bobst SM, Day MC, Gilstrap III LC** et al. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *Am J Hypertens* 2005, 18,330–336.
 58. **Wallukat G, Homuth V, Fischer T** et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 1999, 103,945–952.
 59. **Xia Y, Wen H, Bobst S** et al. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Hynecol Invest* 2003; 10:82–93.
 60. **Zhou CC, Ahmad S, Mi T** et al. Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin / nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension* 2008; 51:1010–1019
 61. **Wellen KE, Gökhan S, Hotamisligil**. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue *J Clin Invest* 2003 112/12,1785-1788.
 62. **do Prado AD, Piovean DM, Strub H L** et al. Association of anticardiolipin antibodies with preeclampsia. A systematic review and meta analysis *Obstet Gynecol* 2010,116,1433-1443.
 63. **Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP** et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995, 85,1504–1508.
 64. **Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J**, et al. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 1997, 95,1777–1782.
 65. **den Heijer M, Blom HJ, Gerrits W Bet** al Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 1995; 345:882–885.
 66. **Eikelboom JW, Lonn E, Genest Jr J** et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease : a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med*1999; 131: 363–375.
 67. **Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N** et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999, 340,9–13.
 68. **Shaughnessy KM, Beiyuan FU, Ferrari F** et al. Factor V Leden and MTHFR gene variants in an east Anglican preeclampsia cohort. *Hypertension* 1999, 33, 1338-41

69. **Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH** et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88:3698–3703.
70. **Frosst P, Blom HJ, Milos R** et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995, 10:111–113.
71. **Jacques PF, Bostom AG, Williams R** et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7–9.
72. **Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JP**. Association of C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with hypertension in pregnancy and preeclampsia: a meta-analysis. *J Hypertens* 2004, 22,1655–1662.
73. **Kahn SR, Platt R, McNamara H** et al. Inherited thrombophilia and preeclampsia within a multicenter cohort: the Montreal Preeclampsia Study. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:151. e151-159; discussion e151-155.
74. **Vogt E, Ng AK, Rote AS**. Antiphosphatidilserine antipody removes annexin V and facilitates the binding of prothrombin at the surface of a choriocarcinoma model of trophoblast differentiation. *Am J Obstet Gynecol* in press.

10 Publikační činnost autora

10.1 Články v časopisech

1. **Hradecký L**, Subrt I, Ulcova Gallova Z. Urgent termination of pregnancy in preclampsia and panel of antiphospholipid antibodies. *American Journal of Reproductive Immunology* 62, 2009 412- 417.
2. Ulcova-Gallova Z, Brabcova H, Kokes V, **Hradecký L**, Novotny Z, Rokyta Z. History of incidence of autoimmune and oncological diseases in identical female twins. *Am J Reprod Immunol*. 2009 Dec, 2(6):349-51.
3. Subrt I, Ulcova- Gallova Z, Bibkova K, Micanova Z, Hejnalova M, Cerna M, **Hradecký L**, Novotny Z. Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in czech women. *American Journal of Reproductive Immunology* 59,2008,193-200.
4. Šigutová P, Hajsmanová Z, Slechtová J, Subrt I, **Hradecký L**, Ulcová-Gallová Z. Sledování hemokoagulačních změn v průběhu těhotenství žen s opakovaným potrácením v závislosti na podávání nízkomolekulárního heparinu. *Česka Gynekol*. 2009;74(5):348-54.
5. Suchá R, Uher P, **Hradecký L**, Kralíčková M, Rokyta Z, Prodloužená kultivace prvojader do blastocyt u kryocyklů. *Praktická gynekologie*. 2005.6, 27.
6. **Hradecký L.**, Suchá R., Uher P, Ulčová-Gallová Z., Rokyta Z.: Intracytoplasmic Morfologically Selected Sperm Injection (IMSI) – a New Metod in the Treatment of Andrological Factor of Infertility. XII. Symposium českých reprodukčních imunologů s mezinárodní účastí, Žďár nad Sázavou, 2006, abstrakt.
7. Ulčová-Gallová Z., Brabcová H., Kokeš V, **Hradecký L.**, Novotný Z, Rokyta Z:

Autoimunitní a onkologická onemocnění u jednovaječných dvojčat ženského pohlaví (kazuistika). XXVII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Olomouc, 2010, abstrakt.

8. Ulcova-Gallova Z., Brabcova H., Kokes L., **Hradecký L.**, Novotny Z., Rokyta Z.: Autoimmune and oncological diseases in identical female twins (case report). 8th European Congress on Reproductive Immunology, Munich, 2010 abstract in *J.Reprod.Immunol.*86, 2010, 106.

10.2 Postery

1. Ulcova-Gallova Z., Brabcova H., Kokes V., **Hradecký L.**, Novotny Z., Rokyta Z.: Autoimmune diseases with oncological complications in identical female twins-case report. VI th Conference on Gonadal Hormones, Pregnancy and Rheumatic Diseases. Lausanne, 2009, abstract.
2. Hudec A, **Hradecký L.**,Korecko V, Turek J. Heterotopic cervical pregnancy- conservative treatment- a case report. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.*2010,36,247.

10.3 Přednášky

1. **Hradecký L.**, Suchá R, Uher P. Úloha IVF v léčbě sterility. Společnost J E Purkyně Plzeň, červen 2005.
2. **Hradecký L.**, Suchá R, Uher P. Možnosti řešení mužské subfertility. Společnost J E Purkyně, Plzeň, květen 2006.
3. **Hradecký L.** IMSI- nová metoda pro rozlišení kvality spermií. XII. celostátní symposium reprodukčních imunologů. Žďár nad Sázavou, květen 2006.
4. **Hradecký L.** Metody asistované reprodukce, možnosti léčby sterility. Semináře pro spolupracující lékaře gynekology. Cheb, říjen 2005; Karlovy Vary, prosinec 2006; Klatovy, březen 2006; Domažlice, květen 2006.
5. **Hradecký L.**, Krmíčková R, Uher P. Ovariální hyperstimulační syndrom jako komplikace v IVF. Prosinčový přednáškový večer pro gynekology Západočeského regionu. Plzeň 2007.
6. **Hradecký L.** Asistovaná reprodukce a onkologický pacient. Prosinčový přednáškový večer pro gynekology západočeského regionu. Plzeň 2008.
7. **Hradecký L.**:Současné směry v reprodukční medicíně- riziko OHSS, IMSI, PID. Zasedání privátních gynekologů plzeňského regionu. Plzeň 2009.
8. **Hradecký L.**: Imunologické faktory vzniku preeklampsie. Spolek lékařů J E. Purkyně, Plzeň 2009.
9. **Hradecký L.**:Využití RIA metod v léčbě IVF. 3 kurz imunoanalýzy, LFUK a FN Plzeň 2011.