

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Receptory pro nebezpečné vzory a prozánětové molekuly v  
pupečnickové krvi - vztah k histologické chorioamnionitidě**

**Eva Mitášová**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program Lékařská imunologie**

**Hradec Králové**

**2013**

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu Lékařské imunologie na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Eva Mitášová  
Ústav klinické imunologie a alergologie, Univerzita Karlova v Praze,  
Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.  
Ústav klinické imunologie a alergologie, Univerzita Karlova v Praze,  
Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: Prof. MUDr. Zdenka Ulčová-Gallová, DrSc.  
Gynekologicko porodnická klinika, Univerzita Karlova v Praze,  
Lékařská fakulta v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň

doc. MUDr. Martin Procházka, Ph.D.  
Porodnicko-gynekologická klinika, Univerzita Palackého v Olomouci  
Lékařská fakulta v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

Práce byla podpořena projektem „PRVOUK“, P37/10, Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty UK v Hradci Králové, specifickým výzkumným projektem UK Praha, LF UK Hradec Králové, projekt č. 264902.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Lékařská imunologie

## Obsah

1. Souhrn .....	4
2. Summary .....	5
3. Úvod do problematiky .....	6
4. Cíle disertační práce .....	8
5. Materiál a metodika .....	9
5.1. Soubor pacientek a metodika .....	9
5.1.1. Soubor pacientek .....	9
5.1.2. Sběr vzorků .....	9
5.2. Diagnostika .....	10
5.2.1. Stanovení předčasného odtoku plodové vody .....	10
5.2.2. Stanovení HCA a funisitidy .....	10
5.2.3. Stanovení MIAC .....	10
5.3. Stanovení koncentrace markerů v pupečnickové krvi .....	10
5.4. Statistika .....	11
6. Výsledky .....	12
6.1. Demografické a klinické výsledky .....	12
6.1.1. Soubor pacientek pro analýzu interleukinů IL-6, IL-8, matrixové metaloproteázy 8, pentraxinu 3 a solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 .....	12
6.1.2. Soubor pacientek pro analýzu solubilní formy Toll like receptoru 2 .....	12
6.2. Koncentrace identifikovaných markerů v pupečnickové krvi - grafový přehled .....	13
6.3. Vzájemná korelace identifikovaných markerů v pupečnickové krvi .....	16
6.5. ROC křivky identifikovaných markerů v pupečnickové krvi k diagnostice funisitidy u žen s PPRM .....	16
7. Diskuse .....	18
8. Závěr .....	23
9. Použitá literatura .....	24
10. Přehled publikační činnosti .....	27

## 1. Souhrn

### Receptory pro nebezpečné vzory a prozáněťové molekuly v pupečnickové krvi - vztah k histologické chorioamnionitidě

Pupečnicková krev představuje nejčasnější možný biologický vzorek plodu/novorozence bez nutnosti invazivního zákroku a bez jakýchkoliv rizik pro matku i dítě, který nám může během krátké doby poskytnout řadu informací o jeho klinickém stavu.

Zvýšené koncentrace prozáněťových markerů v pupečnickové krvi jsou pozorovány u předčasného porodu a předčasného odtoku plodové vody (PPROM) zkomplikovaného intraamniálním zánětem/infekcí (IAI). IAI se manifestuje zánětem plodových obalů, placenty jako histologická chorioamnionitida (HCA), či její nejtěžší formou zánětem pupečnicku, funisitidou. Na základě tohoto zjištění jsme se rozhodli vyšetřit v pupečnickové krvi koncentrace interleukinu IL-6, IL-8, matrixové metaloproteázy 8 (MMP-8), pentraxinu 3 (PTX3), solubilního Toll-like receptoru 2 (sTLR2) a solubilního scavenger receptoru pro hemoglobin (sCD163) a určit jejich vztah k HCA.

Unikátnost předkládané práce spočívá v identifikaci koncentrací sTLR2, sCD163, PTX3 a MMP-8 v pupečnickové krvi ve vztahu k HCA, což dosud nebylo zkoumáno.

Ukázalo se, že hladiny IL-6 a sCD163 v pupečnickové krvi novorozenců žen s PPRM a s HCA byly významně zvýšené ve srovnání se vzorky bez HCA. Ve skupině pacientek s PPRM a s funisitidou byly signifikantně navýšené koncentrace IL-6, IL-8, MMP-8 a sCD163 v pupečnickové krvi oproti skupině pacientek bez známek zánětu. Naopak v hodnotách sTLR2 a PTX3 nebyly zaznamenány výrazné změny mezi skupinami pacientek.

Nejvýznamnější korelace mezi jednotlivými markery v pupečnickové krvi u žen s PPRM a s HCA i u žen s funisitidou byly objeveny mezi IL-6 a IL-8 a mezi sCD163 a MMP-8.

Optimální hraniční hodnota IL-6 v pupečnickové krvi pro diagnózu funisitidy byla stanovena > 13.9 pg/mL (senzitivita 92 %, specifická 77 %) pro IL-8 na 92.5 pg/mL (senzitivita 77 %, specifická 80 %), pro sCD163 byla vypočítána na 1462.0 ng/mL (senzitivita 85 %, specifická 70 %). Hladiny markerů v pupečnickové krvi pro diagnózu HCA a molekuly sTLR2, PTX3 a MMP-8 pro diagnostiku funisitidy u žen s PPRM nesplňovaly požadavek diagnostické efektivnosti testu (AUC nad 75 %).

Námi zvolené ukazatele by mohly být využívány k včasné diagnostice nejzávažnější formy HCA – funisitidy a pomoci při správné lékařské intervenci.

## 2. Summary

### Levels of umbilical cord blood pathogen pattern receptors and proinflammatory molecules – the relation to histological chorioamnionitis

The umbilical cord blood (UCB) represents the earliest biological sample of the fetus/neonate without invasive intervention or any risk for mother and her child during sampling. From the UCB we are able to determine a lot of information about the clinical status of newborn.

The increased UCB levels of proinflammatory markers are associated with preterm birth and preterm premature rupture of membranes (PPROM) with the complication of intraamniotic infection/inflammation (IAI). IAI is manifested by the inflammation of the fetal membranes and placenta like histological chorioamnionitis (HCA) or its the most severe form – the inflammation of the umbilical cord, funisitis. Our aim was therefore to investigate the relation of HCA and immunological parameters interleukin IL-6, IL-8, matrix metalloproteinase 8 (MMP-8), pentraxin 3 (PTX3), soluble form of Toll-like receptor 2 (sTLR2) and soluble form of scavenger receptor CD163 (sCD163) in the UCB

The strengths of our study include quantification of sTLR2, sCD163, PTX3 and MMP-8 in UCB and their relationship to HCA that has never been examined.

There was a significant increase in inflammatory markers IL-6 and sCD163 in UCB in infants exposed to PPRM and HCA compared to those without HCA. There was significant differences in UCB IL-6, IL-8, MMP-8 and sCD163 levels in women with PPRM and with funisitis compared to those without inflammation. However, no significant differences were observed between levels of sTLR2 and PTX3 in UCB in subjects with and without IAI.

The most important correlations in UCB were identified between the levels of IL-6 and IL-8 and then sCD163 and MMP-8 in women with PPRM and HCA/funisitis.

The best cut-off point for the UCB IL-6 in the identification of PPRM women with the presence of funisitis was found 13.9 pg/mL (sensitivity 92 %, specificity 77 %). The cut-off level for the UCB IL-8 was determined 92.5 pg/mL (sensitivity 77 %, specificity 80 %) and for the UCB sCD163 1462.0 ng/mL (sensitivity 85 %, specificity 70 %). The UCB levels of markers for diagnosis HCA and molecules sTLR2, PTX3 and MMP-8 for diagnosis funisitis did not meet the requirements for the diagnostic efficiency test (AUC over 75 %).

The markers measurement in UCB would be used in the early diagnosis of the most severe form of HCA - funisitis and would be helped for appropriate medical intervention.

## 3. Úvod do problematiky

Imunitní systém udržuje integritu organismu a je schopen rozpoznat nebezpečné a škodlivé podněty od těla vlastních a bezpečných struktur a signálů. Má také nezastupitelnou funkci v úspěšném průběhu celého těhotenství, kde musí udržovat toleranci vůči plodu a zároveň ochránit plod před vstupem mikroorganismů. Ukončení těhotenství porodem je výsledkem mnoha faktorů, z nichž vrozená imunita hraje důležitou roli [1].

Předčasný porod představuje jeden z nejzávažnějších problémů současného porodnictví. Významně se podílí na perinatální mortalitě a morbiditě novorozenců. Předčasný odtok plodové vody (PPROM) je zodpovědný zhruba za jednu třetinu předčasných porodů a jeho přesná etiologie není zcela objasněna. PPRM je definován jako porušení integrity plodových obalů s následným odtokem plodové vody, který předchází minimálně 2 hodiny před nástupem děložních kontrakcí. Důsledkem ztenčujících se plodových obalů a následného PPRM je usnadněn průnik bakterií do intrauterinního prostoru. Rozvoj infekce, resp. zánětlivé odpovědi na infekci, je asociován s více než 50% případů PPRM [2, 3]. Intraamniální zánět/infekce (IAI) je nejčastější rizikový faktor asociovaný s předčasným porodem a PPRM. Infekce bývá asymptomatická, zapříčiněná ascendentní invazí bakterií z vagíny [4]. Mikrobiální invaze do amniální dutiny může způsobit zvrat v doposud bezproblémovém těhotenství a vést k intraamniálnímu zánětu, který je následován rozvojem histologické chorioamnionitidy (HCA). Její nejzávažnější forma, zánět pupečnicku (funisitida), odráží zánětlivou odpověď plodu [5, 6].

HCA je definovaná histologickým průkazem zánětlivých změn v placentě, kterou lze odhalit až histopatologickým vyšetřením placenty po porodu. Typickým znakem HCA jako projevu mateřské lokální zánětlivé odpovědi je difúzní infiltrát zánětlivých buněk, nekrotické buňky, edém tkáně či stopy po jejím zhojení. Pacientky s HCA jsou asymptomatické, bez horečky, bolestí v podbřišku, mateřské či fetální tachykardie. Jedná se o tzv. subklinickou HCA. Přitom HCA je asociována s neonatální sepsí a v nejtěžších případech i se smrtí novorozence [7]. Přestup infekce na plod může být aspirační nebo cévní cestou. Histologický nález funisitidy, fetální zánětlivé odpovědi, lze stanovit *post partum* a je stejně jako HCA nejčastěji hodnocena dle stupnice Salafia a kol. [8].

Prozatím neexistuje objektivní biomarker používaný v rutinní praxi, jehož změna by měla významnou vypovídací hodnotu v prenatalní diagnostice HCA u pacientek s těhotenstvím komplikovaným PPRM.

IAI spouští kaskádu zánětlivého procesu infiltrací leukocytů z intravaskulárního prostoru do děložní dutiny. Vstup buněk je závislý na sekreci chemokinů, rodině cytokinů o nízké molekulární hmotnosti, které chemotakticky působí na imunitní buňky a podporují je v prozáněťové aktivaci. Uvolnění chemokinů představuje první biochemické propojení mezi infekcí a následnými strukturálními modifikacemi plodových obalů a děložního čípku, jež předchází PPRM. Chemokin zodpovědný za vstup neutrofilů do tkání chorionu, amnionu a placenty se nazývá IL-8. Asociace mezi infekcí a předčasným porodem je zjevná a většina studií se přiklání k hypotéze, že infekci indukovaná lokální exprese prozáněťových cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, tumor nekrotizujícího faktoru TNF- $\alpha$  a IL-8 v intraamniální dutině vede ke zvýšené produkci prostaglandinů plodovými obaly, které podněcují mateřské buňky myometria ke kontraktilní aktivitě a indukují zralost děložního čípku. Zároveň prozáněťové cytokinové prostředí aktivuje matrixové metaloproteázy (MMP) [9, 10].

V pupečnickové krvi jsou během HCA detekovatelné zvýšené hodnoty proinflamačních cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$  [11, 12]. Prozáněťové cytokiny a MMP působí na plod cytotoxicky a mohou rozvolňovat přirozené bariéry orgánů. Důsledkem může být poškození bílé hmoty mozku (mozková obrna) [13] nebo chronická plicní onemocnění [14], která mají dlouhodobý dopad na zdraví novorozence.

Klíčovou úlohu při průniku mikrobiální infekce má vrozená imunita, která u člověka zaujímá první obrannou linii. Jedná se o archaický způsob obrany, který je fylogeneticky konzervovaný na molekulární úrovni [15]. Kromě klasických membránově vázaných nebo cytoplasmatických receptorů (Toll like receptory - TLR, NOD like receptory), patří mezi imunoregulační molekuly vrozené imunity odštěpené receptory z buněčného povrchu jako solubilní TLR2 (sTLR2) nebo solubilní vychytávací receptor CD163 (sCD163). sTLR2 funguje zejména jako decoy receptor, jež se poutá k mikrobiálním komponentám a tím kompetuje s TLR2 vázanými na povrchu buněk o ligandy. Účinnost TLR2 signalizace je redukována [16]. Protein CD163 slouží jako receptor pro vychytávání haptoglobin-hemoglobinových (Hp-Hb) komplexů, který je exprimován výhradně na makrofázích a monocitech. Solubilní forma CD163 (sCD163) vzniká odštěpením extracelulární části receptoru za pomoci metaloproteázy [17]. Zvýšené koncentrace obou solubilních forem receptorů byly nalezeny při záněťovém stavu organismu v periferní krvi [16, 18, 19]. Protein akutní fáze pentraxin 3 (PTX3) představuje rychlou lokální odezvu na přítomnou infekci a jeho zvýšené hladiny v plodové vodě doprovázejí IAI [20].

#### 4. Cíle disertační práce

Mezi hlavní cíle disertační práce patří:

- stanovení koncentrace receptorů pro nebezpečné vzory v pupečnickové krvi u žen s PPRM
  - změřit hladiny solubilní formy Toll like receptoru 2
  - změřit hladiny solubilního vychytávacího receptoru pro haptoglobin-hemoglobinový komplex (sCD163)
  - změřit hladiny pentraxinu 3
- stanovení koncentrace prozáněťových molekul v pupečnickové krvi u žen s PPRM
  - změřit hladiny interleukinu 6
  - změřit hladiny interleukinu 8
  - změřit hladiny matrixové metaloproteázy 8
- zjištění vztahu stanovovaných markerů v pupečnickové krvi u žen s PPRM
  - k histologické chorioamnionitidě
  - k funisitidě
- určení prediktivní hodnoty stanovovaných molekul v pupečnickové krvi u žen s PPRM
  - k diagnostice histologické chorioamnionitidy a
  - k diagnostice funisitidy.

## 5. Materiál a metodika

### 5.1. Soubor pacientek a metodika

#### 5.1.1. Soubor pacientek

Studie byla schválena Etickou komisí FN Hradec Králové. Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas. Celkem bylo odebráno 170 vzorků pupečnickové krve na porodním sále Porodnické a gynekologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové v období od května 2008 do května 2012 v gestačním týdnu 24+0 až 36+6. Do studie byla zařazena jednočetná těhotenství komplikovaná PPRM s určeným gestačním stářím, bez kongenitálních abnormalit. Ze studie byly vyloučeny pacientky s vícečetným těhotenstvím, s komplikovaným těhotenstvím (hypertenze, preeklampsie, diabetes mellitus, nemoci štítné žlázy, s prodělaným chirurgickým zákrokem během těhotenství a jiné) a/nebo s vrozenými vývojovými vadami plodu či známkami neprospívání plodu (váha plodu o 10% nižší než je předpoklad pro dané gestační stáří, určeno ultrazvukovým vyšetřením). Vaginální výtok a známky hypoxie plodu byly rovněž důvody k vyřazení ze studie.

Gestační věk byl určen na základě poslední menstruace a potvrzen biometrií plodu v prvním trimestru těhotenství, tzv. CRL měřením (Crown-Rump Length) – délka plodu od temene ke kostrči.

#### 5.1.2. Sběr vzorků

Vzorky pupečnickové krve byly odebírány z podvázaného pupečnicku novorozence před porodem placenty. Sběr pupečnickové krve proběhl pomocí uzavřeného vakuového systému pro odběr krve. Následně byly vzorky centrifugovány a séra uschována v polypropylenových zkumavkách při – 70°C až do analýzy.

Po porodu byly placentární tkáně fixovány v 10% neutrálně pufrovaném formalinu. Standardně byly po fixaci odebírány k dalšímu zpracování do parafinových bloků minimálně dva vzorky z placenty, dva vzorky z plodových obalů a jeden vzorek z pupečnicku. Řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem.

## 5.2. Diagnostika

### 5.2.1. Stanovení předčasného odtoku plodové vody

PPROM byl definován jako porušení integrity plodových obalů s následným odtokem plodové vody, který předcházel minimálně 2 hodiny před nástupem děložních kontrakcí. PPRM byl potvrzen Temešváryho testem a pozitivním testem na insulin-like growth factor-binding protein (ACTIM PROM test, Medix Biochemica, Kauniainen, Finland) v poševním hlenu.

### 5.2.2. Stanovení HCA a funisitidy

Diagnóza HCA byla stanovena dle klasifikace Salafia a kol. (26), která hodnotí intenzitu (stupně-grady 1-4) infiltrace neutrofilů v konkrétních kompartmentech placenty, pupečnicku a plodových obalů. HCA byla definována jako: grade 1-4 ve tkáních amnia a/nebo grade 3-4 ve tkáních choria a deciduy a/nebo grade 3-4 v choriové ploténce a/nebo grade 1-4 ve tkáních pupečnicku. Funisitida byla diagnostikována při nálezu v pupečnicku – grade 1-4. Placenta bez leukocytární infiltrace nebo s nálezem - grade 1-2 v choriové ploténce a/nebo grade 1-2 ve tkáních choria a deciduy, byla definována jako placenta s absencí HCA. Vzorky byly vyhodnoceny jedním patologem, který nebyl obeznámen s klinikou pacientek.

### 5.2.3. Stanovení MIAC

MIAC byl stanoven na základě pozitivní real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) v plodové vodě, kde byla zjišťována přítomnost genitálních mykoplazmat (*Ureaplasma* spp., *Mycoplasma hominis*) a/nebo *Chlamydia trachomatis*. a/nebo pozitivním nálezem při aerobní či anaerobní kultivaci. Vyjma nálezu koaguláza negativního *Staphylococcus epidermidis*, který je považován za kožní kontaminát.

## 5.3. Stanovení koncentrace markerů v pupečnickové krvi

Koncentrace sTLR2 byla zjišťována metodou ELISA. Postup byl prováděn podle pokynů výrobce komerčního kitu pro lidský sTLR2 (Usen Life Science & Technology Company, China). Detekční limit pro sTLR2 byl 0.098 ng/mL.

Koncentrace sCD163 byla určena metodou ELISA. Postup byl proveden podle pokynů výrobce komerčního kitu sCD163 (Macro163™, Trillium Diagnostics, LLC, Brewer, USA).

Detekční limit pro sCD163 byl 0.23 ng/mL. Všechny vzorky pupečnickové krve byly naředěny 1:250.

Koncentrace PTX3 byla zjišťována metodou ELISA. Postup byl prováděn podle pokynů výrobce komerčního kitu pro lidský PTX3 (Quantikine Human Pentraxin 3/TSG-14, R&D Systems Inc., USA). Detekční limit pro PTX3 byl 0.025 ng/mL.

Koncentrace IL-6 byla měřena metodou ELISA. Postup byl proveden podle pokynů výrobce komerčního kitu pro IL-6 (Human IL-6 Quantikine, R&D Systems Inc., USA). Detekční limit pro IL-6 byl 0.7 pg/mL.

Koncentrace IL-8 byla zjišťována metodou ELISA. Postup byl proveden podle pokynů výrobce komerčního kitu pro lidský IL-8 (Human CXCL8/IL-8 Quantikine, R&D Systems Inc., USA). Detekční limit pro IL-8 byl 3.5 pg/mL.

Koncentrace MMP-8 byla měřena metodou ELISA. Postup byl proveden podle pokynů výrobce komerčního kitu pro lidský MMP-8 (Human Total MMP-8 Quantikine, R&D Systems Inc., USA). Detekční limit pro MMP-8 byl 0.02 ng/mL.

Všechny absorbance byly měřeny na Multiskan RC ELISA readeru (Thermo Fischer Scientific, USA) při vlnové délce 450 nm.

#### 5.4. Statistika

Normalita dat byla testována Kolmogorov-Smirnov testem. Demografické a klinické charakteristiky znaků s kontinuální variabilitou byly hodnoceny parametrickým t-testem (uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka) nebo neparametrickým Wilcoxonovým testem (uvedeny jako medián [interkvartilový rozsah]). Znaky s kategoričnou binární variabilitou byly hodnoceny Fisherovým exaktním testem a byly uvedeny jako počet (%). Koncentrace sTLR2, sCD163, PTX3, IL-6, IL-8 a MMP-8 v pupečnickové krvi byly hodnoceny neparametrickým Wilcoxonovým testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s  $p < 0.05$ . Všechny  $p$ -hodnoty byly zpracovány v softwarovém programu MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgie).

## 6. Výsledky

### 6.1. Demografické a klinické výsledky

Náběr vzorků probíhal ve dvou etapách, proto je kohorta pacientek rozdělena na dvě skupiny. Pacientky s PPRM byly rozčleněny na základě přítomnosti nebo absence HCA a přítomnosti funisitidy.

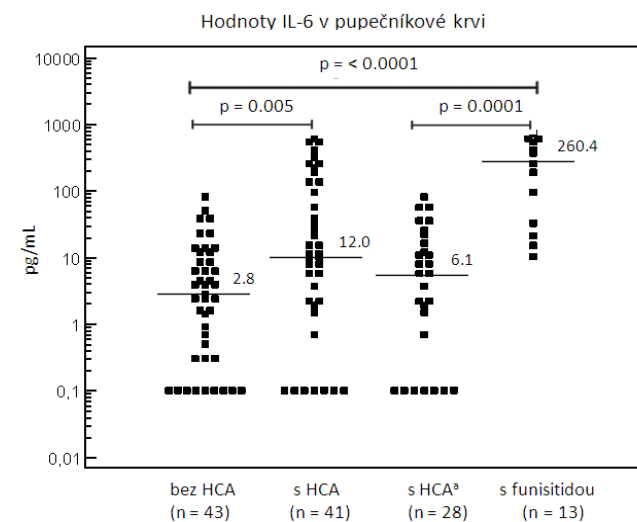
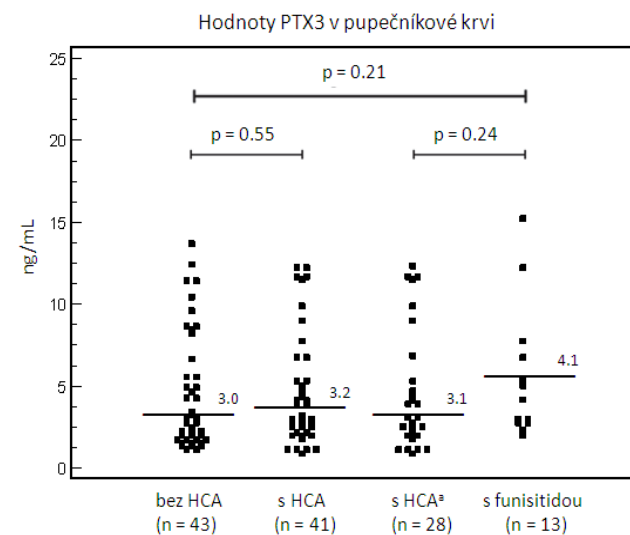
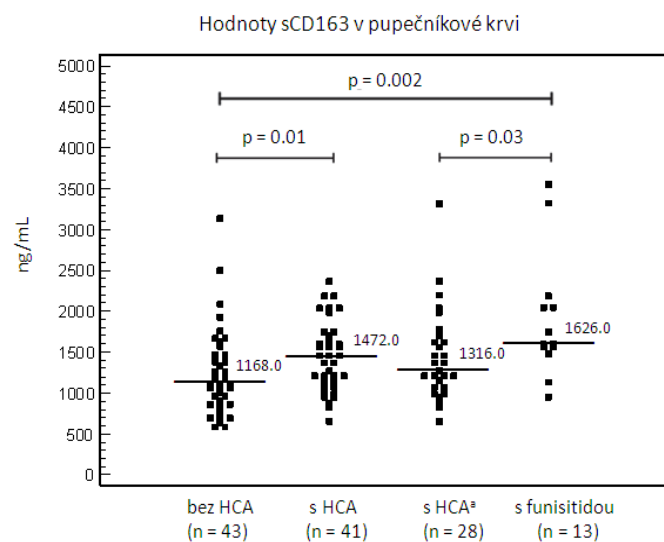
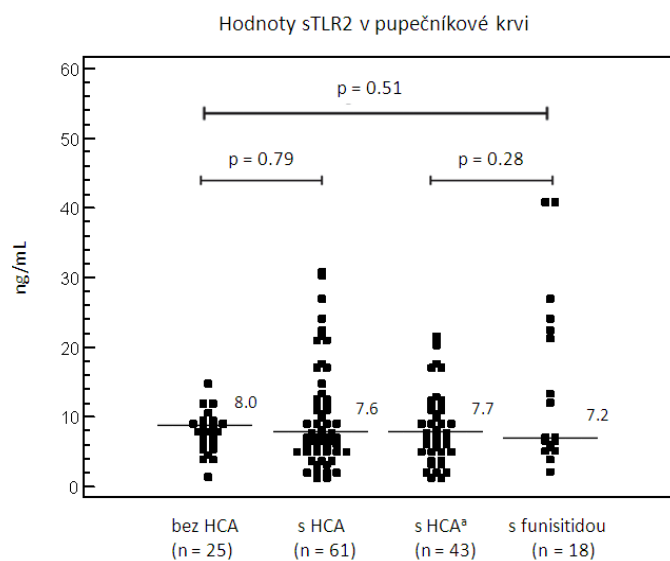
#### 6.1.1. Soubor pacientek pro analýzu interleukinů IL-6, IL-8, matrixové metaloproteázy 8, pentraxinu 3 a solubilní formy vychytávacího receptoru CD163

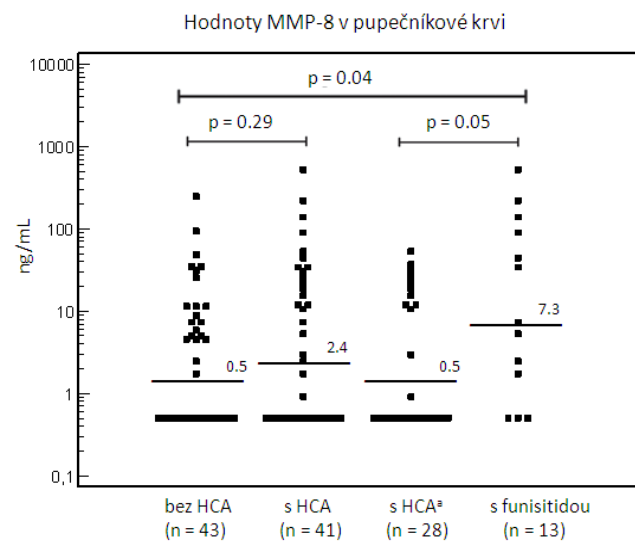
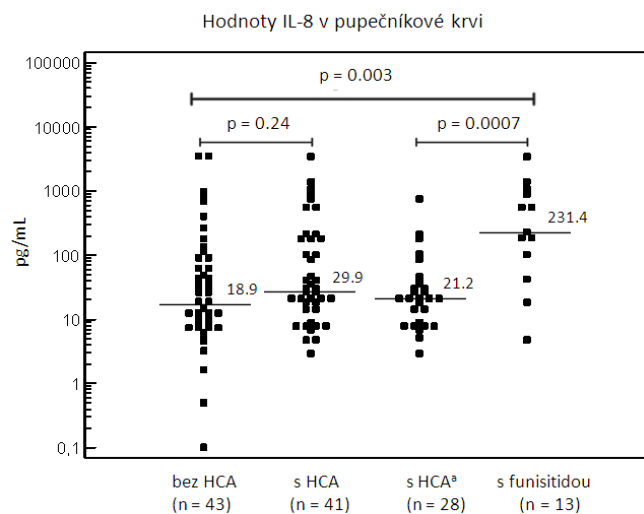
V první skupině pacientek byla z celkových 84 pacientek HCA diagnostikována u 41 (49 %) žen a funisitida u 13 (15 %) žen. Pouze HCA bez funisitidy byla stanovena u 28 pacientek (33 %). Bez známek zánětu bylo 43 žen (51 %). Medián gestačního stáří pacientek s HCA při přijetí na kliniku a při porodu byl nižší než u pacientek bez HCA. Také medián gestačního stáří pacientek s funisitidou při přijetí a při porodu byl signifikantně nižší než u žen bez známek zánětu. Hmotnost novorozenců pacientek s funisitidou byla nižší ve srovnání s hmotností novorozenců žen bez HCA. MIAC byl diagnostikován téměř u 70 % pacientek s funisitidou, což bylo podstatně více v porovnání s pacientkami bez HCA.

#### 6.1.2. Soubor pacientek pro analýzu solubilní formy Toll like receptoru 2

V druhé skupině pacientek byla z celkových 86 pacientek HCA diagnostikována u 61 (71 %) žen a funisitida u 18 (21 %) žen. Pouze HCA bez funisitidy byla stanovena u 43 pacientek (50 %). Bez známek zánětu bylo 25 žen (29 %). Věkový průměr žen postižených HCA byl vyšší v porovnání s ženami bez HCA. Medián gestačního stáří pacientek s HCA při přijetí na kliniku a při porodu byl nižší než u pacientek bez HCA. Rovněž medián gestačního stáří pacientek s funisitidou při přijetí a při porodu byl signifikantně nižší než u žen bez známek zánětu. Vzhledem k nízkému gestačnímu věku pacientek s funisitidou byly většinou podány kortikosteroidy (89 %). Hmotnost novorozenců pacientek s funisitidou byla nižší ve srovnání s hmotností novorozenců žen bez HCA.

## 6.2. Koncentrace identifikovaných markerů v pupečnickové krvi - grafový přehled





### 6.3. Vzájemná korelace identifikovaných markerů v pupečníkové krvi

Souhrn všech vzájemných korelací identifikovaných markerů v pupečníkové krvi, vyjma molekuly solubilního Toll like receptoru 2 (odlišná kohorta pacientek).

	sCD163 (ng/mL)	PTX3 (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	MMP-8 (ng/mL)
sCD163 (ng/mL)	–	$r^2 = 0.23$ $p^2 = 0.42$	$r^2 = -0.10$ $p^2 = 0.73$	$r^2 = -0.06$ $p^2 = 0.85$	$r^2 = 0.69$ $p^2 = 0.02$
PTX3 (ng/mL)	$r^1 = 0.17$ $p^1 = 0.29$	–	$r^2 = 0.46$ $p^2 = 0.11$	$r^2 = 0.47$ $p^2 = 0.10$	$r^2 = 0.34$ $p^2 = 0.24$
IL-6 (pg/mL)	$r^1 = 0.45$ $p^1 = 0.005$	$r^1 = 0.14$ $p^1 = 0.36$	–	$r^2 = 0.89$ $p^2 = 0.002$	$r^2 = 0.03$ $p^2 = 0.91$
IL-8 (pg/mL)	$r^1 = 0.42$ $p^1 = 0.009$	$r^1 = 0.42$ $p^1 = 0.008$	$r^1 = 0.74$ $p^1 < 0.0001$	–	$r^2 = 0.18$ $p^2 = 0.53$
MMP-8 (ng/mL)	$r^1 = 0.58$ $p^1 < 0.0001$	$r^1 = 0.06$ $p^1 = 0.73$	$r^1 = 0.17$ $p^1 = 0.28$	$r^1 = 0.12$ $p^1 = 0.46$	–

Vysvětlivky: IL – interleukin; MMP – matrixová metaloproteáza; PTX – pentraxin; sCD163 – solubilní forma vychytávacího receptoru CD163.

$r$  značí Spearmanův korelační koeficient.

$p$ -hodnota – hladina významnosti.

<sup>1</sup> – korelace mezi jednotlivými markery u pacientek s HCA.

<sup>2</sup> – korelace mezi jednotlivými markery u pacientek s funisitidou.

Statisticky významné výsledky jsou vyznačeny tučně.

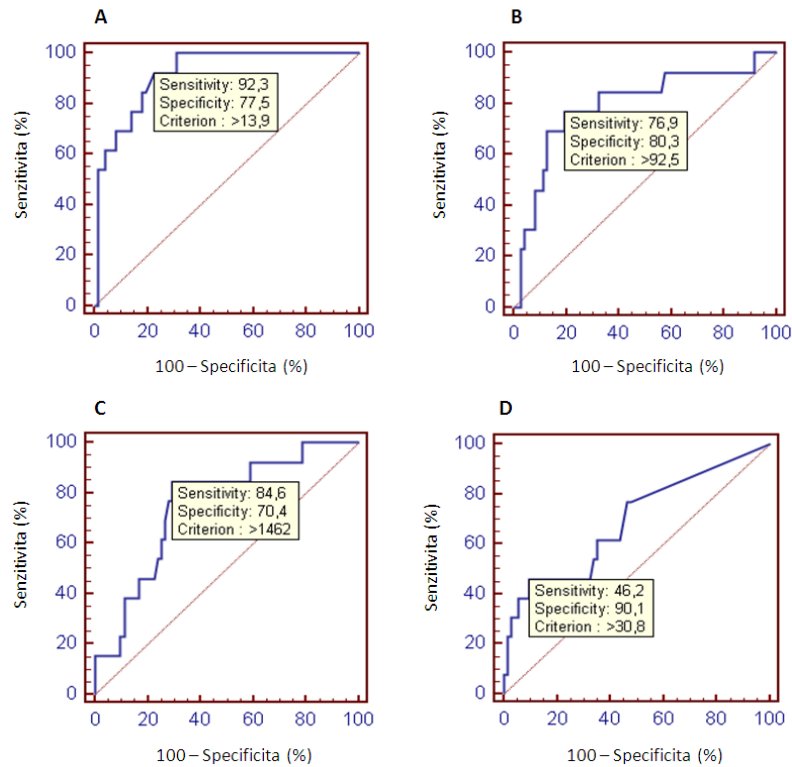
### 6.5. ROC křivky identifikovaných markerů v pupečníkové krvi k diagnostice funisitidy u žen s PPROM

Pomocí ROC byly vyhodnoceny pouze ty ukazatele v pupečníkové krvi, jejichž  $p$  hodnoty byly v porovnání se skupinou bez HCA statisticky významné ( $p \leq 0.05$ ).

Vysvětlivky: HCA – histologická chorioamnionitida; HCA<sup>a</sup> – skupina pacientek s potvrzenou HCA bez funisitidy; IL – interleukin; IQR – interkvartilový rozsah; MMP – matrixová metaloproteáza; PTX – pentraxin; sCD163 – solubilní forma vychytávacího receptoru CD163; sTLR2 – solubilní forma Toll-like receptoru 2



ROC křivka molekul IL-6, IL-8, sCD163 a MMP-8 v pupečnickové krvi ke stanovení funisitidy



Graf prahové operační charakteristiky (Receiver Operating Characteristic, ROC) pro molekuly interleukinu 6 (A), interleukinu 8 (B), solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 (C) a matrixové metaloproteázy 8 (D) v pupečnickové krvi k určení přítomnosti funisitidy.

A. Plocha pod ROC křivkou (Area Under the Curve, AUC) interleukinu 6 zaujímá 92 %;  $p < 0.0001$ .

B. AUC interleukinu 8 zaujímá 80 %;  $p = 0.0001$ .

C. AUC solubilní formy vychytávacího receptoru CD163 zaujímá 75 %;  $p = 0.0003$ .

D. AUC matrixové metaloproteázy 8 zaujímá 69 %;  $p = 0.03$ .

## 7. Diskuse

Celosvětově narůstající počet předčasných porodů vede řadu vědeckých skupin k bádání nad molekulárními příčinami této velmi závažné komplikace. Jeho management je mnohdy zkomplikován přítomností IAI, který koreluje s HCA a/nebo s funisitidou. Zánětové změny v intraamniální dutině se silně podílí na zvýšení perinatální morbidity a mortality novorozenců.

Ač placenta představuje fyzikální a imunologickou bariéru proti vstupu infekčních agens, její ochranná funkce není zcela bezvýhradní. Proto imunitní systém matky v těhotenství i nezralý imunitní systém plodu jsou způsobili k obranné reakci při ascendentním či retrogradním průniku mikroorganismů do amniální dutiny. V obraně zastávají jednu z nejdůležitějších rolí mechanismy vrozené imunity, jež okamžitě odpovídají na přítomnost mikroorganismů. Rozpoznání patogenů receptory pro nebezpečné vzory (PRR) na povrchu buněk je první krok k jejich eliminaci. Patogenní bakterie stimulují hostitelské tkáň a infiltrující imunokompetentní buňky přes PRR k navýšení produkce proteinů akutní fáze CRP, PTX3 a prozánětových cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  a IL-8. Tyto působky slouží jako primární signální síť, která následně podněcuje zejména buňky myometria k produkci efektorových molekul jako jsou prostaglandiny nebo MMPs. Trofoblastové buňky pod vlivem cytokinů zvyšují tvorbu prostaglandinů, cyklooxygenázy a oxytocinových receptorů, což ve výsledku může vést k předčasnému porodu [9]. Probíhající imunitní odpověď je nutné usměrňovat, aby reakce příliš nepoškodila tkáň matky a plodu. Jako jeden z regulátorů imunitní odpovědi slouží rozpustné formy receptorů, jež brání nepřiměřené zánětové reakci.

Koncentrace výše uvedených prozánětových a regulačních molekul je možné sledovat v plodové vodě, kde mají větší či menší vypovídací hodnotu o přítomnosti IAI. I naše skupina zkoumala hladiny řady markerů v plodové vodě, které výrazně korelovaly s přítomnou HCA a/nebo s funisitidou, např. IL-8 [21]. Nevýhodou je nutnost provést invazivní vyšetření k získání plodové vody, které s sebou nese určité riziko pro matku a její dítě. Namísto toho odběr a následné sledování vytipovaných markerů v pupečnickové krvi je naprosto bezbolestná, bezriziková procedura, z které můžeme rychle získat informace o klinickém stavu plodu i matky.

Unikátnost předkládané práce spočívá v identifikaci koncentrací sTLR2, sCD163, PTX3 a MMP-8 v pupečnickové krvi ve vztahu k HCA, které zatím nikdy nebyly zkoumány v této tekutině. Jako další markery jsme zvolili typické představitele prozánětových cytokinů

IL-6 a IL-8. Ve všech testovaných vzorcích byly detekovány všechny zmiňované markery. Jejich vztah k HCA byl poměrně rozmanitý.

Největším přínosem práce je bezesporu objevení silné závislosti mezi přítomnou HCA a koncentrací sCD163. Signifikantní nárůst primárního vychytávacího receptoru pro hemoglobin v pupečnickové krvi byl zaznamenán u pacientek s PPRM a s HCA a/nebo s funisitidou ve srovnání se skupinou žen bez HCA. Nejzávažnější případy s postižením pupečnicku byly asociovány s nejvyššími hodnotami sCD163 v pupečnickové krvi.

K tomu aby došlo k výraznému navýšení sCD163 je třeba delšího trvání zánětu. Až v pozdní fázi akutního zánětu je v monocyttech a makrofázích indukována exprese CD163, která je zapříčiněna zvýšenou hemolýzou a potřebou degradovat Hp-Hb komplexy [22]. Vysoké hodnoty proteolyticky odštěpené formy CD163 byly nalezeny v plasmě během bakteriální sepsy a mnoha jiných akutních i chronických zánětových stavech, kde jsou plně aktivované monocyty/makrofágy [18, 23]. Prozáněťové vlastnosti CD163 jsou zřejmě i hlavním důvodem jeho odštěpování z povrchu monocytů/makrofágů, způsob regulace vlastní aktivity v pozdní fázi záněťové reakce.

Zda část sCD163 není původu mateřského nelze stoprocentně vyloučit, jelikož aktivní přestup této molekuly transportními systémy z mateřské krve nebyl nikdy zkoumán. Nicméně dvě práce Vogelové a kol. se zabývaly koncentracemi sCD163 v periferní krvi předčasně rodících žen. Mediány sCD163 dosáhly hodnot 2.4 mg/mL a 3.4 mg/mL [24, 25]. Při srovnání s hodnotami v pupečnickové krvi (1168.0 ng/mL bez HCA, 1626 ng/mL s funisitidou) můžeme alespoň vyloučit přestup sCD163 přes placentu pasivní difúzí.

Překvapení nastalo při hodnocení výsledků koncentrací sTLR2 v pupečnickové krvi u pacientek s PPRM a s HCA nebo s funisitidou, kde nebyl potvrzen významný nárůst jeho hladin oproti ženám bez zánětu. Přitom nárůst koncentrací sTLR2 byl zaznamenán v plodové vodě při IAI a také v případech jiných zánětlivých onemocnění byly naměřeny výrazně vyšší hladiny sTLR2 [26-28].

Shen a kol. zjistili, že exprese TLR2 na monocytech izolovaných z pupečnickové krve ihned po vaginálním porodu vykazovala signifikantní navýšení oproti vzorkům odebraných z pupečnicku po císařském řezu. Nadcházející přirozený porod je zřejmě spojován s konceptem „přípravy“ přirozeného imunitního systému plodu na obranu při prvním kontaktu s externím prostředím [29]. Zvýšení exprese TLR2 na monocytech podporuje také prostředí značně bohaté na imunomodulační hormony, jež byly v pupečnickové krvi objeveny (endorfin, catecholamin, kortizol) [30].

Také u PTX3 se nepotvrdilo významné navýšení hladiny v pupečnickové krvi u pacientek s PPRM a s HCA a/nebo s funisitidou v porovnání s pacientkami bez zánětu. Mediány koncentrace PTX3 byly u všech skupin naměřeny na podobných hodnotách.

Produkce PTX3 by mohla být snížena působením mediátoru prostaglandinu E2, který během porodu dominuje v krevní cirkulaci matky a který, jak bylo zjištěno, inhibuje TLR-indukovanou produkci PTX3 v myeloidních DC. Další molekulou inhibující produkci PTX3 je IFN- $\gamma$ , jenž je uvolňován při rozpoznání infikovaných buněk zejména fetálními Th1 lymfocyty [31, 32].

Nebylo velkým překvapením, že nejsignifikantnější rozdíl koncentrací v pupečnickové krvi mezi pacientkami s PPRM a s HCA a/nebo s funisitidou ve srovnání s pacientkami bez zánětu byl zaznamenán u IL-6. Bylo možné pozorovat odstupňovanost jeho koncentrací v závislosti na klinickém stavu pacientky a novorozence.

Koncentrace IL-6 v pupečnickové krvi byly zkoumány již více vědeckými skupinami. Závěry jsou shodné s našimi výsledky. Při potvrzené HCA a/nebo funisitidě dochází ke zvýšené produkci IL-6 v pupečnickové krvi [6, 33-35].

Produkce IL-6 je indukována IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ . Aktivuje buňky imunitního systému a podporuje prozáněťový stav v organismu (např. produkci proteinů akutní fáze, produkci protilátek). Navíc jeho vliv přesahuje hranice imunity a je schopen stimulovat buňky myometria k expresi oxytocinových receptorů. Tím dochází ke zvýšené odpovědi tkáně na oxytocin a uspišení procesu porodu [36]. Na druhou stranu je třeba zmínit i pozitivní účinek IL-6 u předčasně narozených dětí. Zvýšené koncentrace IL-6 urychlují dozrávání fetální plicní tkáně stimulací alveolárních buněk typu II k expresi surfaktantového proteinu A (SP-A), jehož hladiny korelují se zralostí plodu a iniciací porodu. Hlavní funkcí SP-A je snižování povrchového napětí na styku vodní fáze a vzduchu v alveolech. Tím IL-6 nepřímo přispívá ke snížení incidence syndromu dechové tísně novorozenců [37].

Dalším prozáněťovým cytokinem, který byl stanoven v pupečnickové krvi u žen s PPRM, byl IL-8. Bylo objeveno jeho signifikantní zvýšení u žen s funisitidou oproti ženám bez záněťových změn a oproti ženám pouze s HCA. Výrazný rozdíl v hodnotách IL-8 v pupečnickové krvi mezi ženami s HCA a bez HCA nebyl zjištěn.

IL-8 byl již dříve identifikován jako potenciální marker HCA v plodové vodě, kde jsou jeho hladiny značně navýšeny v porovnání s pacientkami bez HCA [21, 38]. V pupečnickové krvi D'Alquen a kol. hodnotili hladinu IL-8 ve vztahu k HCA u předčasně rodících žen. Medián koncentrace IL-8 byl v případě HCA téměř sedminásobně a v případě funisitidy až devítinásobně zvýšen ve srovnání s kontrolní skupinou bez záněťových změn [39].

K podobným výsledkům dospěli Witt a kol., kteří srovnávali koncentrace IL-8 v pupečnickové krvi u žen s mikrobiální invazí amniální dutiny (přítomna *Ureaplasma urealyticum*) se skupinou bez invaze patogenů [40]. V pupečnickové krvi byl IL-8 také zkoumán v souvislosti s preeklampsí, kde jeho hodnoty významně převyšovaly normální stav u zdravých žen [41].

Zvýšená koncentrace IL-8 souvisí s aktivací fetálních monocytů, makrofágů a endotelových buněk v pupečniku, které IL-8 produkují [42, 43]. Zásadní účinek IL-8 spočívá v atrahování neutrofilů do místa zánětu. V případě funisitidy je při histologickém vyšetření nalezen infiltrát neutrofilů v pupečniku.

Nejsignifikantnější rozdíl koncentrací v pupečnickové krvi mezi pacientkami s a bez funisitidy byl v této práci zaznamenán u IL-6 a IL-8. To koresponduje s poznatky nedávné studie, která prokázala, že pupečnicková krev má výrazně větší schopnost produkovat IL-6 a IL-8 než krev dospělých. Vysoké hladiny prozáněťových cytokinů mohou hrát roli ve zvýšené morbiditě a mortalitě novorozenců, jež přišli do styku s infekcí [44].

Poslední stanovenou molekulou byla matrixová metaloproteáza MMP-8. Zde bylo objeveno signifikantní zvýšení MMP-8 v pupečnickové krvi u žen s PPRM a s funisitidou oproti ženám bez zánětu a oproti ženám pouze s HCA. Výrazný rozdíl v koncentracích MMP-8 v pupečnickové krvi mezi ženami s HCA a bez HCA nebyl zjištěn.

V pupečnickové krvi byla MMP-8 identifikována pouze v této práci. V jiných kompartmentech však byla přítomnost MMP-8 zkoumána. Poměrně rozsáhlá studie Maymona a kol. se zaměřila na hladiny MMP-8 v plodové vodě u pacientek s i bez IAI rodících předčasně i termínově. Výsledky ukázaly, že spontánní předčasný i termínový porod byl spjat se signifikantním zvýšením koncentrace MMP-8 v plodové vodě, a tyto hodnoty ještě několikanásobně vzrostly při potvrzené mikrobiální invazi amniální dutiny u žen s PPRM i u žen s předčasným porodem a neporušenými plodovými obaly. Samotný PPRM byl asociován se značně zvýšeným množstvím MMP-8 v plodové vodě v porovnání s pacientkami s rupturou plodových obalů v termínu porodu [45].

Vliv kortikosteroidů na produkci stanovených molekul byl vyloučen buď na základě dřívějších výsledků studií nebo na základě vypracovaných přídatných analýz (u sCD163, sTLR2 a PTX3) [46, 47].

Nejsignifikantnější korelace mezi stanovenými markery v pupečnickové krvi byla objevena mezi IL-6 a IL-8 u pacientek s PPRM a s HCA i u pacientek s funisitidou. K obdobnému výsledku došla recentní práce, jež prokázala silnou korelaci koncentrací IL-6 a IL-8 v pupečnickové krvi u více jak 200 novorozenců [48].

Limitací naší práce je menší počet pacientek ve skupině žen s PPRM a funisitidou a to u obou kohort pacientek. Dále u žádné ze stanovených molekul nemůžeme vyloučit omezený přestup přes placentu z mateřské krve, i když u některých molekul je tato možnost eliminována poznatky dřívějších studií. Změny koncentrací stanovených markerů mohou být také ovlivněny uvolňovanými endogenními signály nebezpečí tzv. DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern), které nejsou v práci zohledněny. Práce je zaměřena na přítomnost exogenních faktorů.

Pokud bychom chtěli naměřené koncentrace markerů v pupečnickové krvi aplikovat při diagnostice HCA, musí jejich plocha pod ROC křivkou (AUC) dosáhnout minimálně 75 %. U IL-6 a sCD163 nebylo této hranice dosaženo pro stanovení HCA a proto jej nelze v klinické praxi použít. Skupině Tasci a kol. se podařilo u IL-6 dosáhnout větší senzitivity a specifity pro diagnózu HCA (hraniční bod > 29 pg/ml, senzitivita 74 %, specifita 77 % vs. naše výsledky: hraniční bod > 6.8 pg/ml, senzitivita 63 %, specifita 70 %) [34].

Pro stanovení funisitidy z koncentrace markerů v pupečnickové krvi byla AUC vypočítána nad 75 % u IL-6, IL-8 a sCD163. Nejlepších prediktivních výsledků bylo dosaženo u IL-6, kde hraniční koncentrace pro stanovení funisitidy byla vypočítána na > 13.9 pg/ml (senzitivita 92 %, specifita 77 %). Například Yoon a kol. stanovili hraniční bod pro diagnózu funisitidy na  $\geq 17.5$  pg/mL (senzitivita 70 %, specifita 78 %) [49].

Také další prozáněťový cytokin IL-8 lze využít při stanovení funisitidy z pupečnickové krve u žen s PPRM. Hraniční koncentrace pro diagnózu funisitidy byla v této práci vypočítána na > 92.5 pg/mL (senzitivita 77 %, specifita 80 %). Již dříve byl IL-8 zkoumán jako molekula vhodná k predikci IAI. Santana a kol. stanovili hodnotu IL-8 v pupečnickové krvi vhodnou pro stanovení IAI a časně bakteriální neonatální infekce na > 111.7 pg/mL (senzitivita 78 %, specifita 91 %), což jsou výsledky obdobné našim [50].

Za velký přínos této práce považujeme objevení molekuly sCD163 jako potenciálního markeru funisitidy v pupečnickové krvi. Jelikož tento solubilní protein nebyl dříve nikdy zkoumán v souvislosti s HCA, není možno naše výsledky porovnat s jinými. Mezní koncentrací sCD163 v pupečnickové krvi pro diagnostiku funisitidy byla ustanovena na > 1462.0 ng/mL (senzitivita 85 %, specifita 70 %).

## 8. Závěr

Byly stanoveny koncentrace receptorů pro nebezpečné vzory, konkrétně solubilní forma Toll like receptoru 2, solubilní vychytávací receptor pro haptoglobin-hemoglobinový komplex (sCD163) a pentraxin 3, a koncentrace prozáněťových molekul interleukinu IL-6, IL-8 a matrixové metaloproteázy MMP-8 v pupečnickové krvi u žen s PPRM. V každém vzorku pupečnickové krve byly detekovány všechny zmiňované molekuly metodou ELISA.

Zjistili jsme, že u pacientek s PPRM s potvrzenou HCA byly mediány IL-6 a sCD163 v pupečnickové krvi signifikantně zvýšené oproti skupině bez HCA. U žen s PPRM s funisitidou byly významně zvýšené mediány IL-6, IL-8, sCD163 a MMP-8 ve srovnání se skupinou pacientek bez stop zánětu. Nebyly objeveny signifikantní rozdíly v hladinách molekul sTLR2 a PTX3 mezi pacientkami s HCA, bez HCA a s funisitidou.

Markery v pupečnickové krvi vhodné k diagnostice funisitidy u žen s PPRM se ukázaly být IL-6, IL-8 a sCD163. Hraniční hodnota IL-6 pro stanovení funisitidy u žen s PPRM byla vypočítána na > 13.9 pg/mL (senzitivita 92 %, specificita 77 %, LR+ 4.10, AUC 92 %), pro IL-8 na > 92.5 pg/mL (senzitivita 77 %, specificita 80 %, LR+ 3.90, AUC 80 %) a pro sCD163 byla stanovena na > 1462.0 ng/mL (senzitivita 85 %, specificita 70 %, LR+ 2.86, AUC 75 %). Markery v pupečnickové krvi pro diagnózu HCA u žen s PPRM nesplnily podmínky efektivity testu (AUC nad 75 %).

Cíle disertační práce považujeme za splněné.

## 9. Použitá literatura

1. Osman, I., Young, A., Ledingham, M.A., et al., *Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term*. Mol Hum Reprod, 2003, vol. 9, no. 1, s. 41-5.
2. Menon, R., Yu, J., Basanta-Henry, P., et al., *Short fetal leukocyte telomere length and preterm prelabor rupture of the membranes*. PLoS One, 2012, vol. 7, no. 2, s. e31136.
3. Goldenberg, R.L., Culhane, J.F., Iams, J.D., et al., *Epidemiology and causes of preterm birth*. Lancet, 2008, vol. 371, no. 9606, s. 75-84.
4. Goldenberg, R.L. and Culhane, J.F., *Infection as a cause of preterm birth*. Clin Perinatol, 2003, vol. 30, no. 4, s. 677-700.
5. Tita, A.T. and Andrews, W.W., *Diagnosis and management of clinical chorioamnionitis*. Clin Perinatol, 2010, vol. 37, no. 2, s. 339-54.
6. Gotsch, F., Romero, R., Kusanovic, J.P., et al., *The fetal inflammatory response syndrome*. Clin Obstet Gynecol, 2007, vol. 50, no. 3, s. 652-83.
7. Menon, R., Taylor, R.N., and Fortunato, S.J., *Chorioamnionitis--a complex pathophysiologic syndrome*. Placenta, 2010, vol. 31, no. 2, s. 113-20.
8. Salafia, C.M., Weigl, C., and Silberman, L., *The prevalence and distribution of acute placental inflammation in uncomplicated term pregnancies*. Obstet Gynecol, 1989, vol. 73, no. 3 Pt 1, s. 383-9.
9. Smith, R., *Parturition*. N Engl J Med, 2007, vol. 356, no. 3, s. 271-83.
10. Bowen, J.M., Chamley, L., Keelan, J.A., et al., *Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition*. Placenta, 2002, vol. 23, no. 4, s. 257-73.
11. Mestan, K., Yu, Y., Thorsen, P., et al., *Cord blood biomarkers of the fetal inflammatory response*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2009, vol. 22, no. 5, s. 379-87.
12. Satar, M., Turhan, E., Yapicioglu, H., et al., *Cord blood cytokine levels in neonates born to mothers with prolonged premature rupture of membranes and its relationship with morbidity and mortality*. Eur Cytokine Netw, 2008, vol. 19, no. 1, s. 37-41.
13. Girard, S., Kadhim, H., Roy, M., et al., *Role of perinatal inflammation in cerebral palsy*. Pediatr Neurol, 2009, vol. 40, no. 3, s. 168-74.
14. Dessardo, N.S., Mustac, E., Dessardo, S., et al., *Chorioamnionitis and chronic lung disease of prematurity: a path analysis of causality*. Am J Perinatol, 2012, vol. 29, no. 2, s. 133-40.
15. Kimbrell, D.A. and Beutler, B., *The evolution and genetics of innate immunity*. Nat Rev Genet, 2001, vol. 2, no. 4, s. 256-67.
16. Raby, A.C., Le Boudier, E., Colmont, C., et al., *Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering*. J Immunol, 2009, vol. 183, no. 1, s. 506-17.
17. Weaver, L.K., Hintz-Goldstein, K.A., Pioli, P.A., et al., *Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163*. J Leukoc Biol, 2006, vol. 80, no. 1, s. 26-35.
18. Moller, H.J., *Soluble CD163*. Scand J Clin Lab Invest, 2012, vol. 72, no. 1, s. 1-13.
19. Moller, H.J., Moestrup, S.K., Weis, N., et al., *Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163*. Crit Care Med, 2006, vol. 34, no. 10, s. 2561-6.
20. Kacerovsky, M., Tosner, J., Drahosova, M., et al., *Pentraxin 3 in amniotic fluid as a marker of intra-amniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes*. Int J Gynaecol Obstet, 2010, vol. 108, no. 3, s. 203-6.

21. Kacerovsky, M., Drahosova, M., Hornychova, H., et al., *Value of amniotic fluid interleukin-8 for the prediction of histological chorioamnionitis in preterm premature rupture of membranes*. Neuro Endocrinol Lett, 2009, vol. 30, no. 6, s. 733-8.
22. Fabriek, B.O., van Bruggen, R., Deng, D.M., et al., *The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria*. Blood, 2009, vol. 113, no. 4, s. 887-92.
23. Gaini, S., Pedersen, S.S., Koldkaer, O.G., et al., *New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis*. Clin Exp Immunol, 2008, vol. 151, no. 3, s. 423-31.
24. Vogel, I., Grove, J., Thorsen, P., et al., *Preterm delivery predicted by soluble CD163 and CRP in women with symptoms of preterm delivery*. BJOG, 2005, vol. 112, no. 6, s. 737-42.
25. Vogel, I., Goepfert, A.R., Moller, H.J., et al., *Early mid-trimester serum relaxin, soluble CD163, and cervical length in women at high risk for preterm delivery*. Am J Obstet Gynecol, 2006, vol. 195, no. 1, s. 208-14.
26. Andrys, C., Kacerovsky, M., Drahosova, M., et al., *Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, vol. 26, no. 5, s. 520-7.
27. Candia, E., Diaz-Jimenez, D., Langjahr, P., et al., *Increased production of soluble TLR2 by lamina propria mononuclear cells from ulcerative colitis patients*. Immunobiology, 2012, vol. 217, no. 6, s. 634-42.
28. Srinivasan, M., Kodumudi, K.N., and Zunt, S.L., *Soluble CD14 and toll-like receptor-2 are potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome*. Clin Immunol, 2008, vol. 126, no. 1, s. 31-7.
29. Shen, C.M., Lin, S.C., Niu, D.M., et al., *Labour increases the surface expression of two Toll-like receptors in the cord blood monocytes of healthy term newborns*. Acta Paediatr, 2009, vol. 98, no. 6, s. 959-62.
30. Yektaei-Karin, E., Moshfegh, A., Lundahl, J., et al., *The stress of birth enhances in vitro spontaneous and IL-8-induced neutrophil chemotaxis in the human newborn*. Pediatr Allergy Immunol, 2007, vol. 18, no. 8, s. 643-51.
31. Doni, A., Michela, M., Bottazzi, B., et al., *Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma*. J Leukoc Biol, 2006, vol. 79, no. 4, s. 797-802.
32. Tse, D.B. and Young, B.K., *Co-ordinate expression of Th1/Th2 phenotypes in maternal and fetal blood: evidence for a transplacental nexus*. J Perinat Med, 2012, vol. 40, no. 2, s. 165-70.
33. Pacora, P., Chaiworapongsa, T., Maymon, E., et al., *Funisitis and chorionic vasculitis: the histological counterpart of the fetal inflammatory response syndrome*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2002, vol. 11, no. 1, s. 18-25.
34. Tasci, Y., Dilbaz, B., Uzmez Onal, B., et al., *The value of cord blood interleukin-6 levels for predicting chorioamnionitis, funisitis and neonatal infection in term premature rupture of membranes*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2006, vol. 128, no. 1-2, s. 34-9.
35. Kacerovsky, M., Cobo, T., Andrys, C., et al., *The fetal inflammatory response in subgroups of women with preterm prelabor rupture of the membranes*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, no., s.
36. Rauk, P.N., Friebe-Hoffmann, U., Winebrenner, L.D., et al., *Interleukin-6 up-regulates the oxytocin receptor in cultured uterine smooth muscle cells*. Am J Reprod Immunol, 2001, vol. 45, no. 3, s. 148-53.
37. Shimoya, K., Taniguchi, T., Matsuzaki, N., et al., *Chorioamnionitis decreased incidence of respiratory distress syndrome by elevating fetal interleukin-6 serum concentration*. Hum Reprod, 2000, vol. 15, no. 10, s. 2234-40.
38. Weissenbacher, T., Laubender, R.P., Witkin, S.S., et al., *Diagnostic biomarkers of pro-inflammatory immune-mediated preterm birth*. Arch Gynecol Obstet, 2013, vol. 287, no. 4, s. 673-85.
39. D'Alquen, D., Kramer, B.W., Seidenspinner, S., et al., *Activation of umbilical cord endothelial cells and fetal inflammatory response in preterm infants with chorioamnionitis and funisitis*. Pediatr Res, 2005, vol. 57, no. 2, s. 263-9.
40. Witt, A., Berger, A., Gruber, C.J., et al., *IL-8 concentrations in maternal serum, amniotic fluid and cord blood in relation to different pathogens within the amniotic cavity*. J Perinat Med, 2005, vol. 33, no. 1, s. 22-6.
41. Mellembakken, J.R., Aukrust, P., Hestdal, K., et al., *Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia*. Hypertension, 2001, vol. 38, no. 3, s. 394-8.
42. Athayde, N., Wang, J., Wang, X., et al., *Fetuses delivered following preterm prelabor rupture of the membranes are capable of stimulating a proinflammatory response in endothelial cells*. J Soc Gynecol Investig, 2005, vol. 12, no. 2, s. 118-22.
43. Tatad, A.M., Nesin, M., Peoples, J., et al., *Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes*. Neonatology, 2008, vol. 94, no. 1, s. 8-15.
44. Mohamed, M.A., Cunningham-Rundles, S., Dean, C.R., et al., *Levels of pro-inflammatory cytokines produced from cord blood in-vitro are pathogen dependent and increased in comparison to adult controls*. Cytokine, 2007, vol. 39, no. 3, s. 171-7.
45. Maymon, E., Romero, R., Pacora, P., et al., *Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection*. Am J Obstet Gynecol, 2000, vol. 183, no. 1, s. 94-9.
46. Kumar, P., Venners, S.A., Fu, L., et al., *Association of antenatal steroid use with cord blood immune biomarkers in preterm births*. Early Hum Dev, 2011, vol. 87, no. 8, s. 559-64.
47. Curley, A.E., Sweet, D.G., MacMahon, K.J., et al., *Chorioamnionitis increases matrix metalloproteinase-8 concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from preterm babies*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004, vol. 89, no. 1, s. F61-4.
48. Takahashi, N., Uehara, R., Kobayashi, M., et al., *Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings*. Cytokine, 2010, vol. 49, no. 3, s. 331-7.
49. Yoon, B.H., Romero, R., Park, J.S., et al., *The relationship among inflammatory lesions of the umbilical cord (funisitis), umbilical cord plasma interleukin 6 concentration, amniotic fluid infection, and neonatal sepsis*. Am J Obstet Gynecol, 2000, vol. 183, no. 5, s. 1124-9.
50. Santana, C., Guindeo, M.C., Gonzalez, G., et al., *Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis*. Acta Paediatr, 2001, vol. 90, no. 10, s. 1176-81.

## 10. Přehled publikační činnosti

### Původní články

**Mitášová, E.**, Kacerovský, M., Krejsek, J., Hornychová, H., Andrýs, C. *Solubilní Toll-like receptor 2 v pupečnickové krvi u těhotenství komplikovaných předčasným odtokem plodové vody*. Česká Gynekol., 2013, (přijato do tisku).

Kacerovsky, M., Vavrova, J., Musilova, I., Lesko, D., **Flidrova, E.**, Andrys, C., Hornychova, H., Dosedla, E., Jacobsson, B. *Umbilical cord blood levels of cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate in preterm prelabor rupture of membrane pregnancies complicated by the presence of histological chorioamnionitis*. J Matern Fetal Neonatal Med., 2012, vol. 25, no. 10, s. 1889-1894. **IF = 1,495**

Kacerovsky, M., Drahosova, M., Hornychova, H., Tambor, V., **Flidrova, E.**, Musilova, I., Tosner, J., Andrys, C. *Umbilical cord blood concentration of soluble scavenger receptor for hemoglobin, but not pentraxin 3, is of value for the early postpartum identification of the presence of histological chorioamnionitis*. J Matern Fetal Neonatal Med., 2011, vol. 24, no. 10, s. 1228-1234. **IF = 1,495**

Andrys, C., Drahosova, M., Hornychova, H., Tambor, V., Musilova, I., Tosner, J., **Flidrova, E.**, Kacerovsky, M. *Umbilical cord blood concentrations of IL-6, IL-8, and MMP-8 in pregnancy complicated by preterm premature rupture of the membranes and histological chorioamnionitis*. Neuro Endocrinol Lett., 2010, vol. 31, no. 6, s. 857-863. **IF = 1,296**

### Přehledové články

**Mitášová, E.**, Krejsek, J., Kacerovský, M., Andrýs, C. *Těhotenství a regulační T-lymfocyty*. Alergie, 2012, vol. 14, no. 3, s. 196-202.

**Flidrová, E.**, Andrýs, C., Krejsek, J. *Epigenetické mechanismy a alergie*. Alergie, 2011, vol. 13, no. 2, s. 37-41.

**Flidrová, E.**, Krejsek, J. *Vrozená imunita v patogenezi intraamniální infekce u těhotenství komplikovaného předčasným odtokem plodové vody*. Česká Gynekol., 2011, vol. 76, no. 1, s. 46-50.

### Přednášky a poster na odborných setkáních

**Flidrová, E.**, Kacerovský, M., Leško, D., Andrýs, C. *Zánětlivá odpověď plodových obalů - in vitro model*. 12. celostátní konferenci fetální medicíny s mezinárodní účastí, Praha, 13.1.2012. (přednáška)

**Flidrová, E.** *Soluble Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 in amniotic fluid in women with preterm premature rupture of membranes*. 7th Postgraduate Medical Students Conference, Lékařská fakulta Hradec Králové, 17.10.2011. (přednáška)

**Flidrová, E.** *Epigenetické mechanismy a alergie*. Seminář Phadia, Jetětice, 8.-10.4.2011. (přednáška)

**Flidrová, E.**, Drahošová, M., Kacerovský, M., Tošner, J., Hornychová, H., Andrýs, C. *Amniotic fluid PTX3 as a new marker of histological chorioamnionitis in women with preterm premature rupture of membranes*. Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology in co-operation with the national societies from Croatia, Czech Republic, Hungary, Slovakia and Slovenia, Vienna, 3.-5.12.2010. (poster)

**Flidrová, E.**, Drahošová, M., Kacerovský, M., Tošner, J., Hornychová, H., Andrýs, C. *Pentraxin 3 v plodové vodě jako potenciální marker intraamniálního zánětu u těhotenství komplikovaného předčasným odtokem plodové vody*. XXVII. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Olomouc, 6.-8.10.2010. (poster)